

## **UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**Centro de Investigación del Cáncer-  
Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer  
(Universidad de Salamanca-  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas)**

### **TESIS DOCTORAL**

**Implicación de los receptores ERBB/HER y sus  
ligandos en la búsqueda de nuevas estrategias  
terapéuticas en cáncer de mama**

**Presentada por:**

**Ana María Orive Ramos**

**Dirigida por:**

**Atanasio Pandiella Alonso**

**Salamanca, 2019**



D. **Atanasio Pandiella Alonso**, Profesor de Investigación en Biología y Biomedicina del Consejo Superior de Investigaciones científicas,

## **CERTIFICA:**

Que la presente tesis doctoral titulada “**Implicación de los receptores ERBB/HER y sus ligandos en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer de mama**” presentada por Dña. **Ana María Orive Ramos**, licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro de Investigación del Cáncer-Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CIC-IBMCC), centro mixto de la Universidad de Salamanca y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y que reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a efectos legales, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a 25 de julio de 2019.

Fdo.: Atanasio Pandiella Alonso

Director de la tesis doctoral



*A mis padres*



*“La verdadera ciencia enseña,  
por encima de todo,  
a dudar y a ser ignorante”*

*Miguel de Unamuno*





# ÍNDICE

---



<b>ÍNDICE .....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
1. RECEPTORES ERBB/HER .....	13
1.1. Estructura y activación de los receptores ERBB/HER.....	14
1.2. Ligandos de los receptores ERBB/HER.....	15
1.3. Señalización intracelular a través de los receptores ERBB/HER.....	17
1.4. Conexión entre los receptores ERBB/HER y el cáncer .....	18
1.4.1. EGFR.....	18
1.4.2. HER2.....	19
1.4.3. HER3.....	19
1.4.4. HER4.....	20
1.5. Conexión entre los ligandos de los receptores ERBB/HER y el cáncer .....	20
1.6. Terapias dirigidas contra los receptores ERBB/HER.....	20
1.6.1. Anticuerpos monoclonales. ....	22
1.6.2. TKIs.....	22
1.6.3. ADCs.....	22
2. CÁNCER DE MAMA.....	22
2.1. Subtipos moleculares de cáncer de mama .....	23
2.1.1. Luminal A y luminal B. ....	23
2.1.2. HER2 positivo. ....	24
2.1.3. <i>Basal-like</i> .....	24
2.1.4. <i>Normal breast-like</i> .....	24
2.1.5. <i>Claudin-low</i> .....	24
2.2. Subtipos histológicos de cáncer de mama .....	25
2.3. Opciones de tratamiento del cáncer de mama .....	26

2.3.1.	Terapia hormonal.....	26
2.3.2.	Terapia dirigida contra HER2.....	26
2.3.3.	Quimioterapia.....	27
2.3.4.	Otras terapias dirigidas.....	27
3.	DISEMINACIÓN METASTÁSICA EN CÁNCER DE MAMA.....	28
3.1.	Implicación de ligandos de los receptores ERBB/HER en la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama .....	30
3.2.	Dasatinib .....	31
4.	RESISTENCIA A TRASTUZUMAB EN CÁNCER DE MAMA.....	32
4.1.	Mecanismos de acción de trastuzumab .....	33
4.1.1.	Internalización y degradación de HER2.....	33
4.1.2.	Parada del ciclo celular.....	33
4.1.3.	Inhibición de la vía de PI3K. ....	34
4.1.4.	Inhibición de la angiogénesis.....	34
4.1.5.	Inducción de la respuesta inmune.....	34
4.2.	Mecanismos de resistencia a trastuzumab.....	34
4.2.1.	Enmascaramiento del epítipo.....	35
4.2.2.	Activación de la señalización a través de otros receptores.....	36
4.2.3.	Aumento de la señalización por debajo de HER2. ....	37
4.2.4.	Defectos en la apoptosis o en el control del ciclo celular.....	37
4.2.5.	Inducción deficiente de la respuesta inmune.....	38
4.3.	Estrategias terapéuticas para revertir la resistencia a trastuzumab .....	38
4.4.	Vía ubiquitina-proteasoma de degradación de proteínas .....	39
4.5.	Bortezomib .....	41
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>		<b>43</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>47</b>
1.	REACTIVOS GENERALES Y FÁRMACOS .....	49

---

2. ANTICUERPOS .....	50
3. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	51
3.1. Líneas celulares .....	51
3.2. Descongelación y mantenimiento de las líneas celulares.....	52
3.3. Preservación de las líneas celulares.....	53
4. RECUENTO CELULAR .....	54
5. TRATAMIENTO Y ESTIMULACIÓN CELULAR.....	54
6. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.....	55
7. SILENCIAMIENTO GÉNICO EN LAS LÍNEAS CELULARES .....	55
7.1. Producción de lentivirus .....	55
7.2. Transducción celular .....	56
8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....	56
8.1. Extracción y cuantificación de proteínas.....	56
8.2. IP .....	57
8.3. WB.....	58
9. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS .....	59
10. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE RAS .....	59
10.1. Expresión de la proteína de fusión GST-RBD .....	59
10.2. Purificación de la proteína de fusión GST-RBD.....	60
10.3. Acoplamiento de GST-RBD a bolas de glutatión-Sefarosa™ 4B.....	61
10.4. Precipitación de RAS-GTP .....	61
11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	61
11.1. Extracción y cuantificación de ARN total.....	61
11.2. Síntesis del ADN complementario .....	62
11.3. qRT-PCR.....	63
12. IDENTIFICACIÓN DE LAS DIANAS DE DASATINIB .....	64
12.1. Inmovilización de dasatinib.....	64

12.2. Purificación de las dianas de dasatinib.....	65
12.3. Tinción del gel de poliacrilamida y escisión de las bandas de interés .....	65
12.4 Digestión trípica de las proteínas en el gel de poliacrilamida.....	65
12.5 Identificación de las proteínas de unión a dasatinib.....	66
12.6 Validación de las proteínas identificadas .....	66
13. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....	66
13.1. Ensayo de proliferación celular .....	66
13.2. Ensayo de migración celular .....	67
13.3. Ensayo de invasión celular .....	68
13.4. Ensayo de adhesión al sustrato.....	69
14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> .....	69
14.1. Ensayo de actividad caspasa .....	69
14.2. Ensayo de actividad quimotríptica del proteasoma.....	70
15. ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO .....	71
15.1 Ensayo de ciclo celular.....	71
15.2. Ensayo de apoptosis .....	71
16. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	72
16.1. Animales de experimentación .....	72
16.2. Generación de xenoinjertos.....	72
16.3. Preparación de las muestras tumorales .....	73
17. ANÁLISIS FUNCIONAL DE ENRIQUECIMIENTO GÉNICO .....	73
18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	74
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>75</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>77</b>
1. REGULACIÓN DEL EFECTO DE DASATINIB SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MMP13 .....	79

1.1.	Efecto de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG en las células MCF7 .....	79
1.2.	Efecto de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG en distintas líneas celulares .....	80
1.3.	Efecto de la dosis de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG .....	82
1.4.	Efecto de dasatinib sobre la expresión de <i>MMP13</i> inducida tras la estimulación con NRG.....	82
2.	ANÁLISIS DEL EFECTO DE DASATINIB EN LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR NRG-ERBB/HER EN CÁNCER DE MAMA.....	84
3.	IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A DASATINIB EN CÁNCER DE MAMA.....	88
3.1.	Identificación de las proteínas de unión a dasatinib en las células MCF7 mediante quimio-proteómica .....	88
3.2.	Validación de las proteínas de unión a dasatinib identificadas en las células MCF7 mediante experimentos de precipitación .....	90
4.	ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA SRC DE TIROSINA QUINASAS Y DE CSK EN LA PRODUCCIÓN DE MMP13 .....	91
5.	EFFECTO DE DASATINIB SOBRE LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR INDUCIDAS POR NRG EN CÁNCER DE MAMA .....	94
6.	EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE <i>SRC</i> Y DE <i>YES1</i> SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR INDUCIDAS POR NRG Y MEDIADAS POR MMP13.....	96
7.	EFFECTO DE DASATINIB SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR INDUCIDAS POR NRG Y MEDIADAS POR MMP13 EN OTRO MODELO CELULAR DE CÁNCER DE MAMA.....	98
8.	EFFECTO DE DASATINIB SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR, INVASIÓN LOCAL Y DISEMINACIÓN METASTÁSICA INDUCIDAS POR NRG <i>IN VIVO</i> .....	99
<b>CAPÍTULO 2 (parte del trabajo no publicada por conflicto de interés).....</b>		<b>105</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>		<b>121</b>

1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE DASATINIB EN LA DISEMINACIÓN METASTÁSICA PROMOVIDA POR NRG Y MEDIADA POR MMP13 EN CÁNCER DE MAMA....	123
2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA UBIQUITINA- PROTEASOMA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO SENSIBLES Y RESISTENTES A TRASTUZUMAB (parte del trabajo no publicada por conflicto de interés) .....	132
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>145</b>
<b>FINANCIACIÓN .....</b>	<b>167</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>171</b>



## RESUMEN

---



La familia de receptores tirosina quinasa ERBB/HER en mamíferos está formada por EGFR, HER2, HER3 y HER4, que son activados por los más de cuarenta ligandos de la familia del factor de crecimiento epidérmico conocidos actualmente. Esta familia de receptores y sus ligandos juegan un papel importante en la oncogénesis y en la progresión tumoral del cáncer de mama. El desarrollo de terapias dirigidas contra estos receptores ha mejorado tanto el pronóstico como la calidad de vida de las pacientes. Sin embargo, la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama y la generación de resistencias a los tratamientos empleados en la práctica clínica son los responsables de que esta enfermedad todavía sea incurable. Por este motivo, en el presente proyecto de tesis doctoral nos planteamos como objetivo general la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer de mama que pudieran bloquear o revertir estas situaciones.

Algunos estudios llevados a cabo en nuestro grupo han conducido a la implicación de las neuregulinas (ligandos de HER3 y HER4) en la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama. La activación de los receptores ERBB/HER tras la estimulación con neuregulina desencadena un aumento en la producción de la metaloproteasa de matriz 13, que facilita la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama. En este trabajo mostramos que el inhibidor tirosina quinasa dasatinib inhibe la producción de la metaloproteasa de matriz 13 inducida en respuesta a la estimulación con neuregulina, bloqueando la diseminación metastásica promovida por estos ligandos de la familia de receptores ERBB/HER en cáncer de mama.

El anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2 trastuzumab representa una estrategia terapéutica que ha mejorado considerablemente la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Sin embargo, uno de los principales problemas de esta terapia dirigida contra HER2 consiste en la aparición de resistencias al tratamiento. Una vez instaurada dicha resistencia, se pueden emplear pocas herramientas farmacológicas para frenar la progresión de la enfermedad. En este trabajo proponemos la inhibición farmacológica de la vía ubiquitina-proteasoma de degradación de proteínas al nivel del proteasoma como una opción terapéutica para revertir la resistencia a trastuzumab en células de cáncer de mama HER2 positivo.



## **ABREVIATURAS**

---



---

<b>ADC</b>	Anticuerpo conjugado a fármaco ( <i>antibody-drug conjugate</i> )
<b>ADCC</b>	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ( <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> )
<b>AR</b>	Anfiregulina
<b>ATCC</b>	Colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection)
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico ( <i>bicinchoninic acid</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino ( <i>bovine serum albumin</i> )
<b>BTC</b>	Betacelulina
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclina ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
<b>CHAPS</b>	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's <i>modified</i> Eagle's <i>medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico ( <i>epidermal growth factor</i> )
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>EMT</b>	Transición epitelio-mesénquima ( <i>epithelial-to-mesenchymal transition</i> )
<b>EPG</b>	Epigen
<b>EPR</b>	Epiregulina
<b>ER</b>	Receptor de estrógeno ( <i>estrogen receptor</i> )
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FAK</b>	Quinasa de adhesión focal ( <i>focal adhesión kinase</i> )
<b>FDA</b>	Agencia estadounidense para el control de alimentos y medicamentos (Food and Drug Administration)
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
<b>GST</b>	Glutación S transferasa
<b>HB-EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina ( <i>heparin-binding EGF</i> )
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico

<b>HER</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano ( <i>human epidermal growth factor receptor</i> )
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos ( <i>hepatocyte growth factor</i> )
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano ( <i>horseradish peroxidase</i> )
<b>IGF-1R</b>	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 ( <i>insulin-like growth factor-1 receptor</i> )
<b>IP</b>	Inmunoprecipitación
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos ( <i>mitogen activated protein kinase</i> )
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MLB</b>	Tampón de lisis con magnesio ( <i>magnesium lysis buffer</i> )
<b>MMP</b>	Metaloproteasa de matriz ( <i>matrix metalloproteinase</i> )
<b>mTOR</b>	Diana de la rapamicina en mamíferos ( <i>mammalian target of rapamycin</i> )
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>MUC</b>	Mucina
<b>NES</b>	Puntuación normalizada de enriquecimiento ( <i>normalized enrichment score</i> )
<b>NRG</b>	Neuregulina o neuregulina 1 $\beta$ 2
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PI</b>	Ioduro de propidio ( <i>propidium iodide</i> )
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinasa ( <i>phosphatidyl inositol 3-kinase</i> )
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Fosfolipasa C gamma ( <i>phospholipase C gamma</i> )
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo ( <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
<b>PR</b>	Receptor de progesterona ( <i>progesterone receptor</i> )
<b>PVDF</b>	Difluoruro de polivinilideno ( <i>polyvinylidene difluoride</i> )
<b>RBD</b>	Dominio de unión a RAS-GTP de RAF ( <i>RAS-binding domain</i> )
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute
<b>RTK</b>	Receptor tirosina quinasa ( <i>receptor tyrosine kinase</i> )



---

<b>qRT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa ( <i>quantitative reverse transcriptase polimerase chain reaction</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en condiciones reductoras en gel de poliacrilamida ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>SFK</b>	Quinasa de la familia SRC ( <i>SRC family kinase</i> )
<b>shRNA</b>	Horquilla pequeña de ARN ( <i>short hairpin RNA</i> )
<b>STAT</b>	Proteína transmisora de señales y activadora de la transcripción ( <i>signal transducer and activator of transcription protein</i> )
<b>TBS-T</b>	Tris con Tween® 20 ( <i>tris buffered saline with Tween® 20</i> )
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Factor de crecimiento y transformación de tipo alfa ( <i>transforming growth factor alpha</i> )
<b>TKI</b>	Inhibidor tirosina quinasa ( <i>tyrosine kinase inhibitor</i> )
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>uPA</b>	Activador del plasminógeno de tipo uroquinasa ( <i>urokinase plasminogen activator</i> )
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VEGFR</b>	Receptor del VEGF
<b>WB</b>	Western blot



# I. INTRODUCCIÓN

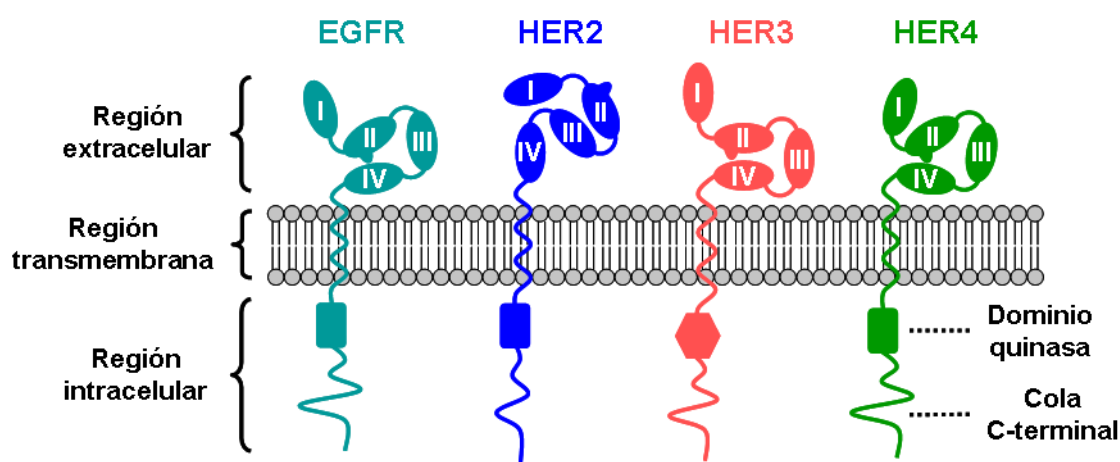
---



## 1. RECEPTORES ERBB/HER

Los receptores ERBB/HER juegan un papel fundamental en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el adulto (Olayioye *et al.*, 2000). La activación de estos receptores está controlada por la expresión espacial y temporal de sus ligandos (Hynes y Lane, 2005). La desregulación de la señalización intracelular desencadenada a través de los receptores ERBB/HER está implicada en la oncogénesis y en la progresión tumoral (Arteaga y Engelman, 2014), motivo por el cual esta familia de receptores, junto con sus ligandos, ha despertado un gran interés en el campo de la investigación en cáncer.

La familia de receptores ERBB/HER constituye la subclase I de la superfamilia de receptores tirosina quinasa (RTKs, *receptor tyrosine kinases*). En mamíferos esta familia está compuesta por cuatro miembros (Figura 1): el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*, también llamado receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1 (HER1, *human epidermal growth factor receptor 1*) o ERBB1), HER2 (ERBB2 o NEU), HER3 (ERBB3) y HER4 (ERBB4).



**Figura 1. Representación esquemática de la familia de receptores ERBB/HER en mamíferos.** Esta familia está compuesta por cuatro miembros, cada uno de los cuales está formado por una región extracelular, una región transmembrana y una región intracelular. La región extracelular está formada, a su vez, por cuatro subdominios (I-IV), mientras que la región intracelular contiene el dominio con actividad tirosina quinasa y la cola C-terminal con numerosos residuos fosforilables, que median la interacción con una gran variedad de moléculas de señalización intracelular.

El primero de los cuatro miembros de la familia en ser descrito fue EGFR, que se identificó originalmente como el producto de un oncogén debido a su homología con la proteína retroviral v-erbB, que permite al virus de la eritroblastosis aviar transformar células de pollo (Downward *et al.*, 1984). Un año después, se describió la secuencia de un RTK que presentaba una gran homología con EGFR y que se denominó HER2 (Coussens *et al.*, 1985). De manera simultánea, este nuevo receptor se encontró amplificado en carcinomas mamarios humanos y se denominó ERBB2 por su homología con la proteína retroviral v-erbB (King *et al.*, 1985). Posteriormente, se describieron los otros dos

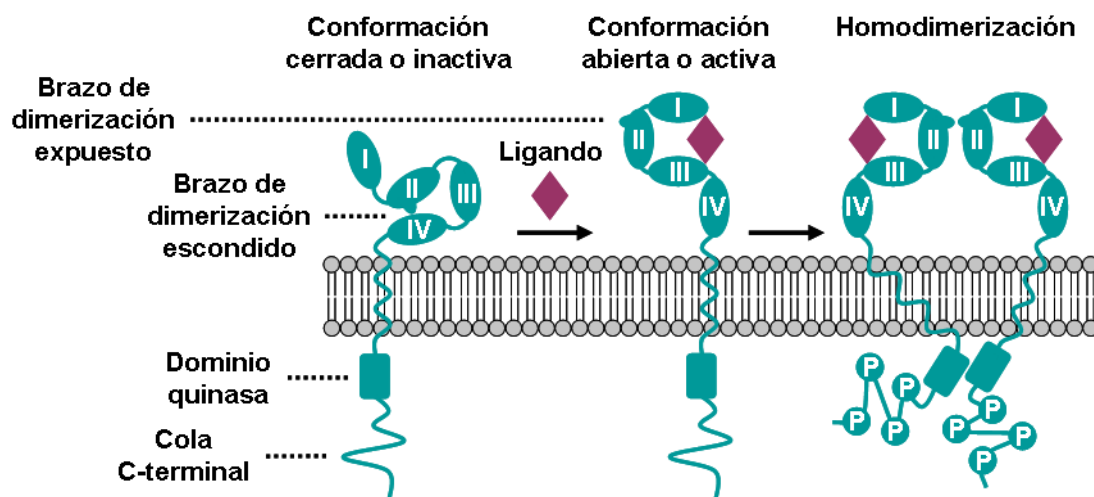
miembros de la familia, HER3 (Kraus *et al.*, 1989) y HER4 (Plowman *et al.*, 1993), los cuales también están implicados en procesos tumorales, como veremos más adelante.

### **1.1. Estructura y activación de los receptores ERBB/HER**

Los receptores ERBB/HER son glicoproteínas transmembrana que presentan una estructura formada por un dominio o región extracelular de unión al ligando, una única región lipofílica transmembrana y una larga cola citoplasmática o región intracelular, que contiene tanto el dominio con actividad tirosina quinasa como numerosos residuos susceptibles de ser fosforilados en el extremo C-terminal (Figura 1) (Linggi y Carpenter, 2006). La región extracelular está formada, a su vez, por cuatro subdominios (I-IV) con abundantes glicosilaciones y puentes disulfuro, que presentan dos conformaciones diferentes en función de la presencia o ausencia del ligando (Figura 2) (Burgess *et al.*, 2003). En ausencia del ligando, el subdominio II interacciona con el subdominio IV dando lugar a una conformación cerrada o inactiva, en la que queda escondido el brazo de dimerización localizado en el subdominio II (Burgess *et al.*, 2003). La unión del ligando al receptor a través de los subdominios I y III induce un cambio conformacional que da lugar a una conformación abierta o activa con el brazo de dimerización expuesto (Burgess *et al.*, 2003). La exposición del brazo de dimerización es fundamental para la activación de los receptores ERBB/HER, que se produce por dimerización entre miembros idénticos (homodimerización) o diferentes (heterodimerización) de la misma familia (Linggi y Carpenter, 2006). La dimerización desencadena la activación del dominio con actividad tirosina quinasa y la autofosforilación de residuos de tirosina presentes en el extremo C-terminal (Linggi y Carpenter, 2006). Además, la activación de los receptores también induce la transfosforilación de residuos de tirosina del receptor compañero del dímero (Zhang *et al.*, 2006). Los residuos fosforilados resultantes sirven como sitios de unión de numerosas proteínas, cuyo reclutamiento da lugar a la activación de vías de señalización intracelular (Olayioye *et al.*, 2000; Yarden y Sliwkowski, 2001; Schlessinger, 2004; Normanno *et al.*, 2005; Hynes y MacDonald, 2009; Eccles, 2011; Roskoski, 2014).

Aunque esta descripción general de la estructura y del mecanismo de activación de los receptores ERBB/HER es común para los cuatro miembros de la familia, existen dos particularidades importantes que atañen a los receptores HER2 y HER3. Por un lado, no se ha descrito ningún ligando capaz de unirse con alta afinidad a la región extracelular del receptor HER2 (Klapper *et al.*, 1999). Sin embargo, este receptor se encuentra permanentemente en la conformación abierta o activa con el brazo de dimerización expuesto (Cho *et al.*, 2003; Garrett *et al.*, 2003), lo que le permite interactuar con los otros miembros de la familia actuando como correceptor (Riese *et al.*, 1995; Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996; Hynes y Lane, 2005; Linggi y Carpenter, 2006). De hecho, HER2 es el compañero de heterodimerización preferido por los demás miembros de la familia (Tzahar *et al.*, 1996; Graus-Porta

*et al.*, 1997). Por otro lado, el receptor HER3 no presenta actividad quinasa intrínseca eficiente en su cola citoplasmática (Guy *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 2010), pero puede transducir señales mediante su interacción con los otros receptores ERBB/HER (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996; Citri *et al.*, 2003; Hynes y MacDonald, 2009; Arteaga y Engelman, 2014).



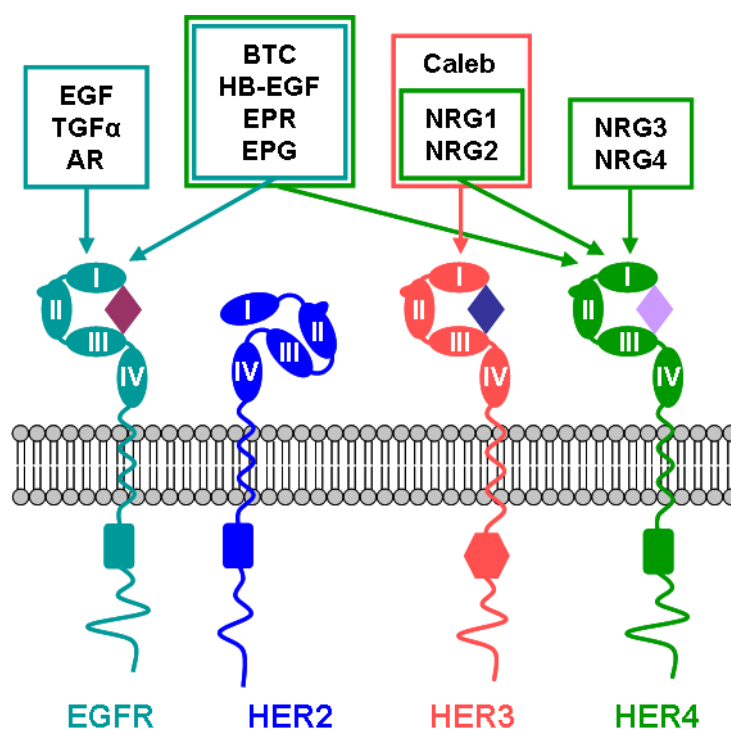
**Figura 2. Activación de los receptores ERBB/HER por unión del ligando y dimerización.** La unión del ligando a los subdominios I y III induce un cambio conformacional en la región extracelular de los receptores, que resulta en la exposición del brazo de dimerización. Este paso es necesario para la formación de dímeros entre receptores idénticos (homodimerización) o diferentes (heterodimerización) de la misma familia y para la subsiguiente activación del dominio tirosina quinasa de los receptores. La activación de este dominio conlleva a la fosforilación de residuos de tirosina en la cola C-terminal (representados con la letra P), que van a desencadenar la activación de vías de señalización intracelular.

## 1.2. Ligandos de los receptores ERBB/HER

Los ligandos responsables de activar a los receptores ERBB/HER pertenecen a la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), dado que todos ellos poseen al menos un motivo EGF en su estructura (Massagué y Pandiella, 1993; Harris *et al.*, 2003). Este dominio está constituido por unos 50 aminoácidos, entre los que se incluyen seis residuos de cisteína que establecen tres puentes disulfuro entre sí (Harris *et al.*, 2003). El dominio EGF es esencial para la unión correcta del ligando al receptor, de manera que los mutantes deficientes en este dominio son incapaces de unirse a los receptores ERBB/HER (Wen *et al.*, 1994). Además, el dominio EGF es suficiente para promover la activación del receptor, como se ha descrito con las versiones recombinante (Holmes *et al.*, 1992) y sintética del mismo (Barbacci *et al.*, 1995).

En la actualidad, se conocen más de cuarenta ligandos de la familia del EGF en mamíferos. La unión de los distintos ligandos de la familia a los receptores ERBB/HER no se produce de manera indiscriminada, sino que presentan cierta especificidad de receptor (Figura 3). De hecho, estos ligandos pueden dividirse en tres grupos en función de su afinidad por los diferentes miembros de la familia ERBB/HER (Anderson y Ahmad, 2002; Normanno *et al.*, 2005). El primer grupo está formado por el EGF, el factor de crecimiento y transformación de tipo alfa (TGF $\alpha$ , *transforming*

*growth factor alpha*) y la anfiregulina (AR), los cuales se unen específicamente a EGFR. El segundo grupo incluye la betacelulina (BTC), el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF, *heparin-binding EGF*), la epiregulina (EPR) y el epigen (EPG), que muestran afinidad dual por los receptores EGFR y HER4. El tercer grupo está constituido por las diferentes isoformas de las neuregulinas (NRGs, también llamadas heregulinas) y por caleb, que presentan distinta capacidad para interaccionar con HER3 y HER4. Este grupo es el más numeroso, ya que existen más de treinta isoformas de las NRGs en mamíferos (Falls, 2003; Breuleux, 2007; Hayes *et al.*, 2007). La generación de esta gran variedad de NRGs es consecuencia del procesamiento alternativo del ARN mensajero de cuatro genes (*NRG1-4*) (Falls, 2003; Breuleux, 2007; Hayes *et al.*, 2007). Mientras que las isoformas de las NRGs codificadas por los genes *NRG1* y *NRG2* tienen capacidad de unión a HER3 y HER4, las isoformas codificadas por *NRG3* y *NRG4* solo presentan capacidad de unión a HER4. Finalmente, caleb se une específicamente a HER3. Como hemos comentado anteriormente, ninguno de los ligandos de la familia del EGF es capaz de unirse a HER2 con alta afinidad. Sin embargo, se ha descrito que un miembro de la familia de las mucinas, mucina 4 (MUC4), actúa como un modulador intramembrana de la actividad de HER2 (Ramsauer *et al.*, 2003).



**Figura 3. Ligandos de la familia del EGF y receptores ERBB/HER con los que interaccionan.** Los distintos ligandos de la familia del EGF van a promover patrones específicos de fosforilación de los receptores ERBB/HER, lo que, a su vez, va a dictar la duración de los eventos de señalización intracelular y la divergencia de las respuestas celulares.

Los ligandos de los receptores ERBB/HER son producidos como precursores transmembrana, que posteriormente son procesados por la acción de proteasas de superficie dando lugar a la liberación de ligandos solubles (Massagué y Pandiella, 1993; Montero *et al.*, 2000; Montero *et al.*, 2002; Borrel-

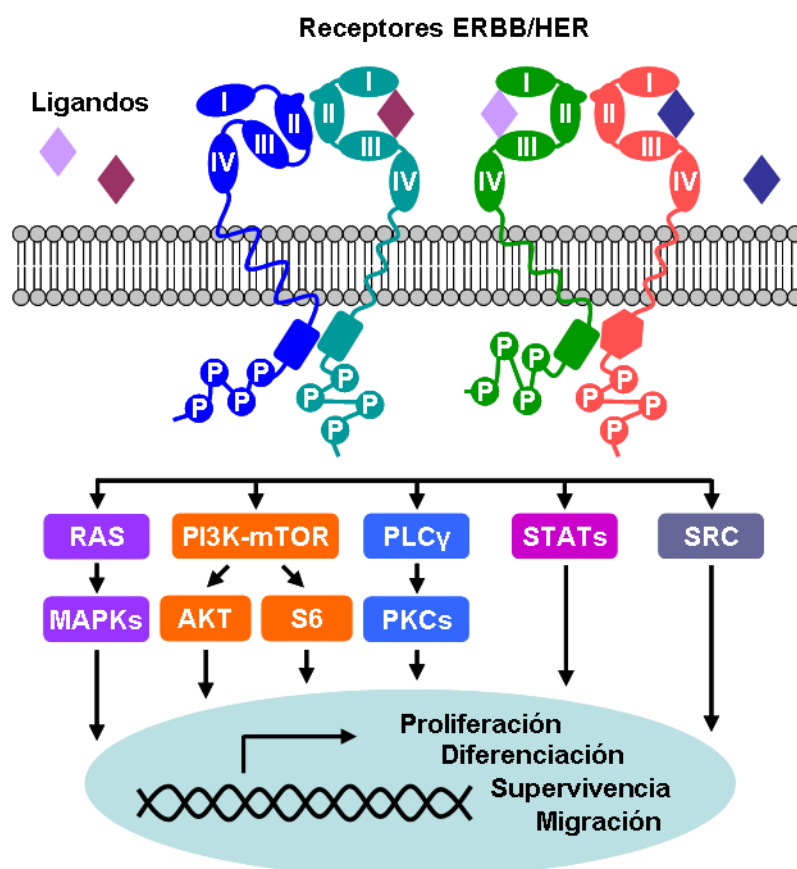


Pagès *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2003). Las proteasas involucradas en este proceso pertenecen a la familia de las metaloproteasas y, en particular, a la familia ADAM (Blobel, 2005; Higashiyama *et al.*, 2008; Roskoski, 2014). Este procesamiento constituye un paso importante en el control de la disponibilidad del ligando y en la subsiguiente activación de los receptores (Hynes y Lane, 2005). El procesamiento de los ligandos puede ser estimulado por diversos factores, incluyendo citoquinas que se unen a receptores acoplados a proteínas G o a través de ligandos Wnt que se unen a los receptores Frizzled (Eccles, 2011). Los productos liberados tras el procesamiento del precursor transmembrana se han visto implicados en la activación autocrina o paracrina de receptores ERBB/HER adyacentes, mientras que los fragmentos intracelulares C-terminales remanentes pueden tener funciones adicionales en la señalización intracelular (Higashiyama *et al.*, 2008). Los ligandos que no han sido procesados y que, por lo tanto, permanecen como precursores transmembrana también pueden estimular los receptores ERBB/HER de las células adyacentes mediante un mecanismo de activación yuxtacrina (Eccles, 2011).

### 1.3. Señalización intracelular a través de los receptores ERBB/HER

La activación de los receptores ERBB/HER estimula múltiples vías de señalización intracelular (Figura 4). Las dos vías de señalización intracelular principales activadas por los receptores ERBB/HER son las vías de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, *mitogen activated protein kinases*) y la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, *phosphatidyl inositol 3-kinase*) (Olayioye *et al.*, 2000; Yarden y Sliwkowski, 2001; Schlessinger, 2004; Normanno *et al.*, 2005; Hynes y MacDonald, 2009; Eccles, 2011; Roskoski, 2014). Las diferencias observadas en cuanto a la potencia y a la cinética de activación de la vía de PI3K por los distintos miembros de la familia pueden deberse a que PI3K se acopla directamente a HER3 y HER4, mientras que lo hace de forma indirecta con los receptores EGFR y HER2 (Soltoff y Cantley, 1996). De hecho, HER3 es un activador de la vía de PI3K muy potente, ya que posee seis sitios de unión para la subunidad reguladora p85 de PI3K (Eccles, 2011). Otras vías importantes relacionadas con la señalización a través de estos receptores incluyen a la fosfolipasa C gamma (PLCγ, *phospholipase C gamma*), que es activada por EGFR y HER2 participando en la generación de segundos mensajeros (Hynes y Lane *et al.*, 2005; Kadamur y Ross, 2013; Roskoski, 2014); a las proteínas transmisoras de señales y activadoras de la transcripción (STATs, *signal transducer and activator of transcription proteins*), las cuales se han asociado con la activación de EGFR en cáncer (Grandis *et al.*, 2000; Yu y Jove, 2004); a la tirosina quinasa SRC, cuya actividad se ve incrementada a través de la señalización mediada por EGFR y HER2 (Ishizawa y Parsons, 2004), y a la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR, *mammalian target of rapamycin*), una serina/treonina quinasa que se activa por debajo de la vía de PI3K y de otros reguladores del crecimiento (Bjornsti y Houghton, 2004).

La activación de las distintas vías de señalización a través de los receptores ERBB/HER conlleva en último lugar a la inducción de diferentes respuestas biológicas, tales como la proliferación, diferenciación, supervivencia, migración, invasión o angiogénesis (Olayioye *et al.*, 2000; Yarden y Slivkowski, 2001; Eccles, 2011). Como todas estas respuestas biológicas son críticas en el desarrollo y en el mantenimiento de la homeostasis, no es sorprendente que las alteraciones en alguno de los componentes de estas vías de señalización tengan como consecuencia la aparición de patologías como el cáncer (Eccles, 2011; Arteaga y Engelman, 2014).



**Figura 4. Representación esquemática de las vías de señalización intracelular activadas por los receptores ERBB/HER.** Aunque todos los receptores ERBB/HER comparten algunas de estas vías de señalización intracelular, cada receptor modula preferentemente ciertas vías debido al acoplamiento de distintas proteínas adaptadoras y efectoras específicas.

#### 1.4. Conexión entre los receptores ERBB/HER y el cáncer

Los receptores ERBB/HER están implicados en el desarrollo de diversos tipos de cáncer mediante la hiperactivación de su señalización, que puede estar inducida por la sobreexpresión o la activación constitutiva de los mismos (Yarden y Slivkowski, 2001).

**1.4.1. EGFR.** La sobreexpresión de EGFR debida a la amplificación del gen que lo codifica se ha descrito en una gran variedad de carcinomas, incluyendo de cabeza y cuello, pulmón o mama, y en otros tipos de tumores (Yarden y Pines, 2012). Además, esta sobreexpresión está asociada con un mayor grado histológico del tumor, un incremento de la proliferación y una menor supervivencia de

los pacientes (Yarden y Sliwkowski, 2001). En tumores cerebrales, la sobreexpresión de EGFR es una alteración genética muy frecuente y la amplificación de *EGFR* se ha observado aproximadamente en el 50 % de los gliomas de alto grado (Yarden y Pines, 2012). Asimismo, la amplificación de *EGFR* en glioblastoma está asociada frecuentemente con deleciones de *EGFR* (Sugawa *et al.*, 1990; Frederick *et al.*, 2000). Dentro de ellas, la deleción de los exones 2-7 en el dominio extracelular, que da lugar a la variante constitutivamente activa del receptor EGFRvIII, se ha encontrado en el 40 % de los gliomas de alto grado con amplificación de *EGFR* (Sugawa *et al.*, 1990). La segunda variante de EGFR más común en glioblastoma es EGFRc958. Esta variante, que carece de los aminoácidos 521-603, se ha observado en el 20 % de los glioblastomas multiformes con amplificación de *EGFR* (Frederick *et al.*, 2000). Finalmente, también se han identificado mutaciones somáticas activadoras en el dominio tirosina quinasa de EGFR en un conjunto de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, que responden muy bien a la inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004; Pao *et al.*, 2004).

**1.4.2. HER2.** La amplificación de *HER2* que da lugar a la sobreexpresión del receptor se describió por primera vez en un subgrupo de tumores de mama (Slamon *et al.*, 1987), pero también ocurre en otros tipos de cáncer, como gástrico, esofágico, de ovario o de glándulas salivales (Hynes y Lane, 2005; Arteaga y Engelman, 2014). En cáncer de mama la amplificación de *HER2* tiene lugar aproximadamente en el 20 % de los tumores y está asociada con un mal pronóstico (Slamon *et al.*, 1987). Aunque tradicionalmente se ha asociado la sobreexpresión de HER2 con su activación, se han identificado algunas formas oncogénicas del receptor generadas por duplicaciones, inserciones o mutaciones puntuales en su secuencia en varios cánceres humanos (Arteaga y Engelman, 2014). Las mutaciones somáticas descritas en *HER2* son mutaciones sin sentido en los dominios extracelular y tirosina quinasa del receptor, así como duplicaciones o inserciones en una porción del exón 20 (Arteaga y Engelman, 2014). Varios de estos mutantes presentan una señalización aumentada y están asociados a cáncer de mama lobular, de vejiga, de endometrio, gástrico y adenocarcinoma de pulmón (Arteaga y Engelman, 2014).

**1.4.3. HER3.** El receptor HER3 ha sido tradicionalmente asociado al cáncer debido principalmente a su papel como correceptor de HER2 y EGFR, al favorecer la señalización oncogénica a través de estos receptores (Arteaga y Engelman, 2014). Sin embargo, se han identificado mutaciones somáticas en *HER3* en un conjunto de tumores de mama y gástricos (Jaiswal *et al.*, 2013). La mayoría de estas mutaciones se localizan en la región extracelular del receptor y confieren potencial oncogénico independiente de la unión del ligando, pero dependiente de la heterodimerización con HER2 (Jaiswal *et al.*, 2013). Además, la sobreexpresión de HER3 también se ha observado en distintos tipos de cáncer, como gástrico, pancreático, de cabeza y cuello, de mama, de

ovario, de cuello uterino y melanoma, en los que está asociada con un mal pronóstico (Ocana *et al.*, 2013).

**1.4.4. HER4.** Se han identificado también mutaciones somáticas en *HER4* en distintos tipos de cáncer, como gástrico, colorrectal, de mama, de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y melanoma, (Soung *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2008; Prickett *et al.*, 2009). Estas mutaciones se localizan en diferentes dominios del receptor, entre los que destacan el dominio extracelular y el dominio tirosina quinasa (Soung *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2008; Prickett *et al.*, 2009). Además, el estudio en profundidad de las mutaciones sin sentido identificadas en melanoma ha revelado que todas ellas resultan en un aumento de la fosforilación del receptor, de su actividad quinasa y de la capacidad transformante (Prickett *et al.*, 2009). La sobreexpresión de *HER4* también se ha observado en algunos tipos de cáncer, como el de mama y el de vejiga, en los que curiosamente se ha correlacionado con un buen pronóstico, a diferencia de lo que sucede con los otros miembros de la familia (Witton *et al.*, 2003; Memon *et al.*, 2004).

## **1.5. Conexión entre los ligandos de los receptores ERBB/HER y el cáncer**

La sobreproducción de los ligandos de la familia del EGF es otro de los mecanismos por el que algunos tumores activan de manera aberrante la señalización intracelular a través de los receptores ERBB/HER (Yarden y Sliwkowski, 2001). Esta sobreproducción puede tener lugar tanto en las propias células tumorales como en las células del estroma circundantes (Arteaga y Engelman, 2014). De todos los ligandos de la familia, la relevancia de TGF $\alpha$  en los procesos tumorales es la mejor caracterizada. La sobreexpresión de TGF $\alpha$  se ha observado en distintos cánceres humanos, como de cabeza y cuello escamosos, de ovario, de pulmón y colorrectal, en los que se correlaciona con un mal pronóstico de los pacientes cuando se asocia con la sobreexpresión de EGFR (Salomon *et al.*, 1995; Rubin Grandis *et al.*, 1998). En cáncer de páncreas, la sobreexpresión de TGF $\alpha$  se correlaciona con el tamaño del tumor y con una disminución de la supervivencia de los pacientes (Yamanaka *et al.*, 1993). El patrón de expresión de TGF $\alpha$  en cáncer de próstata parece cambiar a medida que la enfermedad progresa, pasando de ser expresado por las células del estroma en las etapas iniciales del cáncer de próstata dependientes de andrógenos, a ser expresado por las células tumorales en las etapas avanzadas de independencia de andrógenos (Scher *et al.*, 1995).

## **1.6. Terapias dirigidas contra los receptores ERBB/HER**

El papel central de los miembros de la familia ERBB/HER en cáncer, junto con la accesibilidad para su manipulación extracelular y el amplio conocimiento de su función biológica, han posicionado a estos receptores como una diana atractiva para su intervención farmacológica (Yarden y Sliwkowski, 2001). De hecho, se han realizado numerosos esfuerzos para el desarrollo de terapias

dirigidas contra los receptores ERBB/HER (especialmente contra EGFR y contra HER2), las cuales han demostrado su eficacia clínica en distintos tipos de cáncer (Tabla 1), mejorando tanto el pronóstico como la calidad de vida de los pacientes (Cai *et al.*, 2010; Roskoski, 2014). La mayoría de estas terapias pertenecen a dos categorías, que consisten en anticuerpos monoclonales y en inhibidores tirosina quinasa (TKIs, *tyrosine kinase inhibitors*). En los últimos años está emergiendo una tercera categoría derivada de los anticuerpos monoclonales, que está compuesta por anticuerpos conjugados a fármacos (ADCs, *antibody-drug conjugates*).

**Tabla 1. Terapias dirigidas contra receptores ERBB/HER aprobadas en la práctica clínica**

Nombre	Diana	Uso
<b><i>Anticuerpos monoclonales</i></b>		
Cetuximab (Erbix®)	EGFR	Cáncer colorrectal metastásico con expresión de EGFR y sin mutaciones en <i>RAS</i> Cáncer de cabeza y cuello escamoso
Panitumumab (Vectibix®)	EGFR	Cáncer colorrectal metastásico con expresión de EGFR y con <i>RAS</i> no mutado
Necitumumab (Portrazza®)	EGFR	Cáncer de pulmón no microcítico escamoso metastásico
Trastuzumab (Herceptin®)	HER2	Cáncer de mama HER2 positivo tanto precoz como metastásico Cáncer gástrico HER2 positivo metastásico
Pertuzumab (Perjeta®)	HER2	Cáncer de mama HER2 positivo metastásico.
Trastuzumab-dttb (Ontruzant®)*	HER2	El mismo que el fármaco de referencia trastuzumab
Trastuzumab-pkrb (Herzuma®)*	HER2	El mismo que el fármaco de referencia trastuzumab
Trastuzumab-qyyp (Trazimera®)*	HER2	El mismo que el fármaco de referencia trastuzumab
Trastuzumab-dkst (Ogivri®)	HER2	El mismo que el fármaco de referencia trastuzumab
<b><i>Inhibidores tirosina quinasa</i></b>		
Gefitinib (Iressa®)	EGFR	Cáncer de pulmón no microcítico metastásico con delección del exón 21 o con la mutación L858R en <i>EGFR</i>
Erlotinib (Tarceva®)	EGFR	Cáncer de pulmón no microcítico metastásico con delección del exón 21 o con la mutación L858R en <i>EGFR</i> Cáncer de páncreas metastásico
Osimertinib (Tagrisso®)	EGFR	Cáncer de pulmón no microcítico metastásico con la mutación T790M en <i>EGFR</i>
Vandetanib (Caprelsa®)	EGFR	Cáncer medular de tiroides metastásico.
Lapatinib (Tykerb®)	EGFR/HER2	Cáncer de mama HER2 positivo metastásico.
Neratinib (Nerlynx®)	EGFR/HER2	Cáncer de mama HER2 positivo
<b><i>Anticuerpos conjugados a fármacos</i></b>		
Trastuzumab-emtansina (T-DM1, Kadcyla®)	HER2	Cáncer de mama HER2 positivo metastásico

\* Fármacos biosimilares de trastuzumab.

**1.6.1. Anticuerpos monoclonales.** Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos presentes en el dominio extracelular de los receptores ERBB/HER comenzaron a desarrollarse en los años 80 con la intención de bloquear la activación del receptor (Sato *et al.*, 1983; Drebin *et al.*, 1985) y varios de ellos están aprobados para su uso en la práctica clínica en el tratamiento de distintos tipos de cánceres (Tabla 1) (Carvalho *et al.*, 2016). A pesar de su uso tan extendido, todavía no se conocen con exactitud los mecanismos responsables de su acción antitumoral. Entre los mecanismos identificados se encuentran el bloqueo de la activación del receptor, la parada del ciclo celular, la inducción de la apoptosis, la inhibición de la angiogénesis y la promoción de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (Carvalho *et al.*, 2016).

**1.6.2. TKIs.** Estos inhibidores son moléculas pequeñas y sintéticas capaces de atravesar la membrana plasmática de la célula y de competir con el ATP por su sitio de unión en el dominio quinasa de los receptores ERBB/HER (Levitzki y Gazit, 1995). La competición va a conducir a la inhibición de la actividad tirosina quinasa de los receptores, bloqueando la señalización desencadenada a través de los mismos (Anderson y Ahmad, 2002; Fry, 2003). En concreto, estos TKIs se unen al bolsillo de unión a ATP de manera reversible o irreversible (Fry, 2003). Además, la especificidad de estos inhibidores es variable, de manera que encontramos TKIs que son altamente específicos de su diana, mientras que otros son capaces de inhibir simultáneamente distintos receptores ERBB/HER. Algunos de estos TKIs han sido aprobados para su uso en la práctica clínica y se recogen en la tabla 1.

**1.6.3. ADCs.** Esta estrategia terapéutica consiste en un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular de los receptores ERBB/HER al que se le ha unido covalentemente un agente citotóxico a través de un enlace sintético (Beck *et al.*, 2017; Vezina *et al.*, 2017). Para que un ADC ejerza su acción antitumoral, tiene que internalizarse en la célula diana expresora del receptor y procesarse a través de la vía lisosomal para liberar el agente citotóxico (Vezina *et al.*, 2017). La difusión del compuesto a través de la membrana del lisosoma va a permitir que acceda a su diana molecular, induciendo la muerte celular (Vezina *et al.*, 2017). La combinación de trastuzumab con emtansina, un potente agente antimicrotúbulos derivado de la maitansina (Lewis Phillips *et al.*, 2008; Lambert y Chari, 2014), constituye el único ejemplo dentro de esta categoría aprobado para su uso en la práctica clínica (Tabla 1) (Amiri-Kordestani *et al.*, 2014).

## 2. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea, que, a su vez, representa un problema de salud pública debido a su alta incidencia y mortalidad. De acuerdo con los datos

estimados por la Organización Mundial de la Salud en 2012 dentro del proyecto GLOBOCAN, el cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres a nivel mundial y constituye la primera causa de muerte por cáncer en la población femenina (Ferlay *et al.*, 2015). Cada año se diagnostican 1,67 millones de nuevos casos de cáncer de mama (25,1 % de todos los cánceres diagnosticados) y alrededor de 522.000 pacientes mueren por esta enfermedad en todo el mundo (14,7 % de las muertes por cáncer) (Ferlay *et al.*, 2015).

Debido a su gran complejidad y heterogeneidad, los tumores de mama muestran diferentes comportamientos biológicos con diferentes respuestas a los tratamientos. Este escenario ha impulsado la realización de grandes esfuerzos encaminados a identificar distintos subtipos de cáncer de mama que permitan mejorar tanto el diagnóstico temprano como el tratamiento eficaz de la enfermedad (Perou *et al.*, 2000; Sørli *et al.*, 2001; Herschkowitz *et al.*, 2007; Prat *et al.*, 2010).

## 2.1. Subtipos moleculares de cáncer de mama

Los análisis de expresión génica mediante chips de ADN o *microarrays* llevados a cabo durante los últimos diecinueve años han conducido a la identificación de seis subtipos de cáncer de mama en función de sus perfiles de expresión génica: luminal A, luminal B, HER2 positivo, *basal-like*, *normal breast-like* y *claudin-low* (Eroles *et al.*, 2012).

**2.1.1. Luminal A y luminal B.** Los tumores luminales se identificaron inicialmente como un único subtipo caracterizado por la expresión de receptores hormonales, que incluyen al receptor de estrógenos (ER, *estrogen receptor*) y al receptor de progesterona (PR, *progesterone receptor*), junto con otros genes típicamente expresados por las células luminales epiteliales de la mama (Perou *et al.*, 2000). La expansión subsiguiente de este trabajo con una cohorte de pacientes mayor mostró que el subtipo luminal se podía dividir en al menos dos grupos (luminal A y luminal B) asociados con un pronóstico diferente (Sørli *et al.*, 2001). Los tumores del subtipo luminal A son los más frecuentes y representan el 50-60 % de los tumores de mama (Eroles *et al.*, 2012). Estos tumores se caracterizan también por una expresión baja de genes relacionados con la proliferación celular y están asociados con un buen pronóstico (Sørli *et al.*, 2001). Los tumores del subtipo luminal B representan el 10-20 % de los tumores de mama (Eroles *et al.*, 2012). Estos tumores presentan un fenotipo más agresivo, mayor grado histológico, mayor índice proliferativo y peor pronóstico que los del subtipo luminal A (Eroles *et al.*, 2012). La principal diferencia biológica entre estos dos subtipos consiste en el aumento de la expresión de genes relacionados con la proliferación celular en los tumores del subtipo luminal B (Eroles *et al.*, 2012). Además, mientras que los tumores del subtipo luminal A se caracterizan por la ausencia de expresión de HER2, los del subtipo luminal B expresan frecuentemente HER2 y EGFR (Eroles *et al.*, 2012).

**2.1.2. HER2 positivo.** Los tumores del subtipo HER2 positivo reciben esta denominación debido a que son sobreexpresores del receptor HER2 y representan el 10-15 % de los tumores de mama (Eroles *et al.*, 2012). Además, estos tumores se caracterizan por la ausencia de expresión de los receptores hormonales (ER y PR) y por una expresión elevada de genes relacionados con la proliferación celular (Eroles *et al.*, 2012). Los tumores de este subtipo son muy proliferativos, tienen alto grado histológico y más del 40 % presentan mutaciones en *TP53* (Eroles *et al.*, 2012). Desde el punto de vista clínico, las pacientes con esta clase de tumor tienen un pronóstico relativamente pobre, con propensión a sufrir recaídas tempranas frecuentes y metástasis distantes (Reddy, 2011).

**2.1.3. Basal-like.** El subtipo *basal-like* representa el 10-20 % de los carcinomas de mama (Eroles *et al.*, 2012). El término fue acuñado debido a que los tumores de este subtipo expresan genes que normalmente expresan las células mioepiteliales o basales de la mama (Perou *et al.*, 2000). Así, estos tumores se caracterizan por la ausencia de expresión de los receptores hormonales y de sobreexpresión de HER2, junto con la expresión de EGFR y de las citoqueratinas 5 y 17 (Perou *et al.*, 2000; Rakha *et al.*, 2008). Morfológicamente, los tumores *basal-like* tienen alto grado histológico, alto índice mitótico, presencia de zonas necróticas e infiltraciones linfocíticas visibles (Livasy *et al.*, 2006; Bosch *et al.*, 2010). Estos tumores son diagnosticados frecuentemente entre mujeres jóvenes y están asociados con un pronóstico peor que el de los tumores luminales (Sørlie *et al.*, 2001; Sørlie *et al.*, 2003). El hecho de que estos tumores presenten una tasa de mutaciones en *TP53* muy elevada podría explicar su gran agresividad y mal pronóstico (Sørlie *et al.*, 2001). Además, los tumores de este subtipo están relacionados con el cáncer hereditario, ya que todos los tumores de mama portadores de mutaciones germinales en el gen *BRCA1* se han clasificado como *basal-like* (Sørlie *et al.*, 2003).

**2.1.4. Normal breast-like.** Los tumores de este subtipo no encajan en ninguna de las categorías descritas anteriormente y representan el 5-10 % de los cánceres de mama (Eroles *et al.*, 2012). Estos tumores no están bien caracterizados y se agrupan junto a las muestras de tejido mamario normal en los dendogramas resultantes de los análisis de expresión génica (Perou *et al.*, 2000). Los tumores *normal breast-like* expresan genes característicos del tejido adiposo y presentan un pronóstico intermedio entre los de los subtipos luminales y *basal-like* (Eroles *et al.*, 2012). Además, estos tumores se caracterizan por la ausencia de expresión de los receptores hormonales y de HER2, sin posibilidad de ser confundidos con los tumores *basal-like* debido a que tampoco expresan EGFR ni la citoqueratina 5 (Eroles *et al.*, 2012).

**2.1.5. Claudin-low.** El último subtipo de cáncer de mama identificado se conoce como *claudin-low* y representa el 12-14 % de los tumores de mama (Eroles *et al.*, 2012). Estos tumores se caracterizan por la falta de expresión tanto de los receptores hormonales como de HER2 y por una baja expresión de genes involucrados en adhesión intercelular, incluyendo distintas claudinas, cingulina,



occludina y E-cadherina (Herschkowitz *et al.*, 2007; Prat *et al.*, 2010). Además, los tumores *claudin-low* sobreexpresan genes relacionados con la respuesta inmune, con la diferenciación mesenquimal y con la transición epitelio-mesénquima (EMT, *epithelial-to-mesenchymal transition*) (Prat *et al.*, 2010; Prat y Perou, 2011). Estos tumores poseen propiedades biológicas únicas asociadas a las células madre de la mama y muestran características de células iniciadoras del tumor (Prat *et al.*, 2010; Prat y Perou, 2011). Los tumores de este subtipo tienen alto grado histológico y están asociados con un mal pronóstico, a pesar de su baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular (Eroles *et al.*, 2012).

## 2.2. Subtipos histológicos de cáncer de mama

Aunque actualmente se considera que el análisis de los perfiles de expresión génica de los tumores de mama constituye la mejor herramienta para clasificarlos, la aplicación de las técnicas genómicas en la mayoría de los hospitales no es factible debido a su alto coste y complejidad (De Laurentiis *et al.*, 2010). El método rutinario empleado para la clasificación de los tumores de mama en la práctica clínica consiste en el análisis clásico por inmunohistoquímica de los receptores hormonales (ER y PR) y de HER2. Utilizando este método sencillo se pueden distinguir tres subtipos histológicos: positivo para receptores hormonales, HER2 positivo y triple negativo, que se caracteriza por la ausencia de expresión de ER, PR y HER2 (De Laurentiis *et al.*, 2010). Los tumores positivos para receptores hormonales se correlacionan con los subtipos luminal A y luminal B, los tumores HER2 positivo con el subtipo molecular homónimo y los tumores triple negativo constituyen un grupo muy heterogéneo al incluir los subtipos *basal-like*, *normal breast-like* y *claudin-low* (Tabla 2). Aunque el subtipo triple negativo represente el 15 % de todos los tumores de mama diagnosticados, es el responsable del alto índice de mortalidad de esta enfermedad, puesto que está formado por tumores que presentan una evolución clínica agresiva y un mal pronóstico (De Laurentiis *et al.*, 2010).

**Tabla 2. Principales características de los subtipos de cáncer de mama**

Subtipo histológico	Subtipo molecular	Características
Positivo para receptores hormonales	Luminal A	Expresión de ER y PR. Baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Ausencia de expresión de HER2.
	Luminal B	Expresión de ER, PR y de genes relacionados con la proliferación celular. Expresión frecuente de HER2 y de EGFR.
HER2 positivo	HER2 positivo	Sobreexpresión de HER2. Ausencia de expresión de ER y PR. Expresión elevada de genes relacionados con la proliferación celular. Mutaciones frecuentes en <i>TP53</i> .
Triple negativo	<i>Basal-like</i>	Ausencia de expresión de ER, PR y HER2. Expresión de EGFR y de las citoqueratinas 5 y 17. Mutaciones frecuentes en <i>TP53</i> y en <i>BRCA1</i> .
	<i>Normal-like</i>	Ausencia de expresión de ER, PR, HER2, EGFR y citoqueratina 5.
	<i>Claudin-low</i>	Ausencia de expresión de ER, PR y HER2. Baja expresión de claudinas, cingulina, occludina y E-cadherina. Sobreexpresión de genes relacionados con la respuesta inmune, la diferenciación mesenquimal y la EMT.

## 2.3. Opciones de tratamiento del cáncer de mama

Las opciones de tratamiento del cáncer de mama son diversas y la elección del mismo para cada paciente se realiza de manera personalizada en función de distintos factores, entre los que, además del subtipo tumoral, se encuentran el estadio del tumor, el riesgo de recurrencia, la presencia de mutaciones germinales en los genes *BRCA1* o *BRCA2*, la edad de la paciente, su estado de salud general, su condición menopáusica o sus preferencias. Aunque la elección del tratamiento se realice de manera personalizada, existen algunas recomendaciones generales para los distintos estadios del tumor. El tratamiento del cáncer de mama en estadios temprano y localmente avanzado comienza generalmente por la cirugía para extirpar el tumor (García-Saenz *et al.*, 2015). En los casos en los que los tumores sean de gran tamaño o presenten un crecimiento muy rápido, se puede aplicar un tratamiento sistémico con terapia hormonal, terapia dirigida contra HER2 o quimioterapia antes de la cirugía. Este tratamiento, denominado terapia neoadyuvante, tiene por objetivo reducir el tamaño del tumor y facilitar su extirpación. Una vez extirpado el tumor, la recomendación general consiste en la aplicación de un tratamiento, que recibe el nombre de terapia adyuvante, para eliminar las células tumorales que hayan podido quedar después de la cirugía y reducir el riesgo de recurrencia (García-Saenz *et al.*, 2015). La terapia adyuvante puede ser local con radioterapia o sistémica con terapia hormonal, terapia dirigida contra HER2 o quimioterapia. En el estadio avanzado o metastásico del cáncer de mama el tratamiento principal será sistémico con terapia hormonal, terapia dirigida contra HER2, otras terapias dirigidas o quimioterapia (Gavilá *et al.*, 2015).

**2.3.1. Terapia hormonal.** La terapia hormonal está indicada únicamente para el tratamiento de tumores con expresión de receptores hormonales. Como estos tumores dependen de hormonas para mantener su crecimiento, la terapia hormonal tiene como objetivo el bloqueo de la acción de los estrógenos en las células cancerígenas o la disminución de los niveles de estrógenos en el cuerpo. Para bloquear la acción de los estrógenos se administran moduladores selectivos de los receptores de estrógeno como tamoxifeno (Nolvadex®) y toremifene (Fareston®) o el antagonista del receptor de estrógenos fulvestrant (Faslodex®), mientras que para disminuir los niveles de estrógenos se utilizan los inhibidores de la aromatasa anastrozol (Arimidex®), exemestano (Aromasin®) y letrozol (Femara®).

**2.3.2. Terapia dirigida contra HER2.** Las terapias dirigidas contra HER2 consisten en tratamientos diseñados contra este receptor y se emplean específicamente para el tratamiento de los tumores HER2 positivo. Como hemos comentado anteriormente, dentro de esta estrategia terapéutica se incluyen los anticuerpos monoclonales trastuzumab (Herceptin®), pertuzumab (Perjeta®) y los biosimilares de trastuzumab, el ADC trastuzumab-emtansina (Kadcyla®) y los TKIs lapatinib (Tykerb®) y neratinib (Nerlynx®).

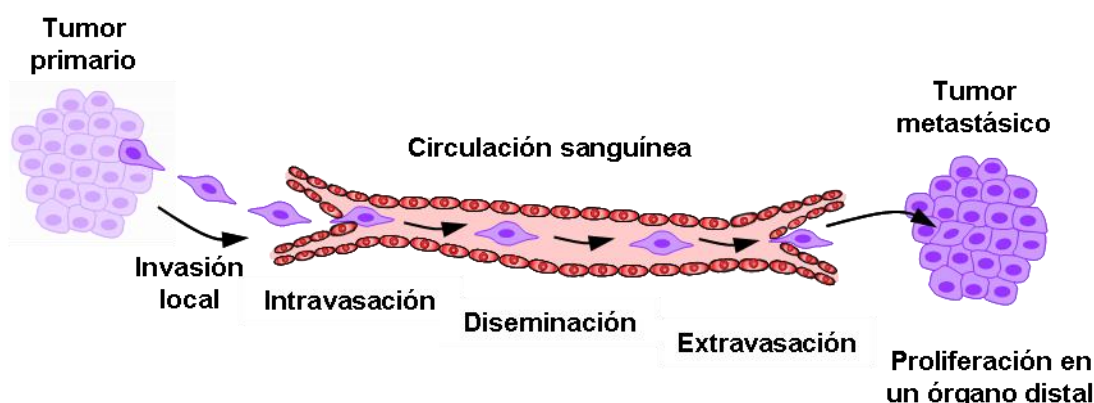
**2.3.3. Quimioterapia.** La quimioterapia consiste en el uso de fármacos que destruyen las células cancerígenas, al impedir generalmente su crecimiento y división. Esta estrategia terapéutica es la única opción de tratamiento de los tumores triple negativo, ya que son resistentes a las terapias hormonal y dirigida contra HER2 (Reddy, 2011). La lista de fármacos empleados para el tratamiento del cáncer de mama es amplia y entre los más comunes encontramos los siguientes: capecitabina (Xeloda®), carboplatino (Paraplatin®), cisplatino (Platinol®), ciclofosfamida (Neosar®, Cytosan®), docetaxel (Docefrez®, Taxotere®), doxorubicina (Adriamycin®), doxorubicina liposomal pegilada (Doxil®), eribulina (Halaven®), epirubicina (Ellence®), fluorouracilo (Adrucil®), gemcitabina (Gemzar®), ixabepilona (Ixempra®), metotrexato (múltiples nombres comerciales), paclitaxel (Taxol®), paclitaxel unido a albúmina (Abraxane®) y vinorelbina (Navelbine®). La administración de estos fármacos se puede realizar de manera individual o combinada para potenciar su efectividad. Además, la quimioterapia también se puede combinar con las terapias hormonal o dirigida contra HER2, en los casos que presenten alto riesgo de recurrencia.

**2.3.4. Otras terapias dirigidas.** Además de la terapia hormonal y de la terapia dirigida contra HER2, en el tratamiento del cáncer de mama metastásico se emplean otras terapias dirigidas contra proteínas específicas. El inhibidor de mTOR everolimus (Afinitor®) o los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, *cyclin-dependent kinases*), particularmente de CDK4 y CDK6, palbociclib (Ibrance®), ribociclib (Kisqali®) y abemaciclib (Verzenio®) se administran en combinación con terapia hormonal para favorecer el bloqueo de la división celular y el crecimiento de tumores positivos para receptores hormonales. El inhibidor de las proteínas PARP olaparib (Lynparza®) constituye la terapia dirigida para mujeres con mutaciones germinales en los genes *BRCA*. Tanto las proteínas PARP como *BRCA1* y *BRCA2* están implicadas en la reparación del ADN dañado. El bloqueo de las proteínas PARP en las células con mutaciones germinales en los genes *BRCA*, que presentan dificultad para reparar el daño en el ADN, conduce normalmente a la muerte de estas células.

Los avances en el tratamiento del cáncer de mama y en los programas de detección precoz conseguidos durante los últimos años han mejorado considerablemente la supervivencia de las pacientes. Sin embargo, la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama y la generación de resistencias a los tratamientos son los responsables de que esta enfermedad todavía sea incurable. El conocimiento de los mecanismos que promueven estos procesos es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que puedan prevenirlos y, de este modo, aumentar la supervivencia de las pacientes.

### 3. DISEMINACIÓN METASTÁSICA EN CÁNCER DE MAMA

La diseminación metastásica en cáncer de mama es un proceso complejo determinado por numerosos factores y vías de señalización (Scully *et al.*, 2012). En líneas generales este proceso se puede dividir en una serie de pasos secuenciales conocidos como cascada metastásica (Figura 5), que las células tumorales tienen que completar para abandonar el tumor primario y desarrollar un nuevo tumor en un sitio distante (Hunter *et al.*, 2008; Mego *et al.*, 2010).



**Figura 5. Representación esquemática del proceso metastásico.** Las células tumorales invaden el tejido circundante hasta que, mediante intravasación, entran en el sistema vascular, por el cual se diseminan por el cuerpo. Eventualmente, estas células se van a extravasar en un órgano distal, en el que la proliferación dará lugar a la formación de un nuevo tumor metastásico.

El proceso metastásico comienza con la invasión del tejido circundante por parte de las células tumorales hasta que entran en la circulación sanguínea o linfática (Hunter *et al.*, 2008; Mego *et al.*, 2010). Para que tenga lugar la invasión del tejido circundante, las células tumorales van a alterar en primer lugar los procesos de adhesión célula-célula y los de adhesión a la matriz extracelular (MEC) (Scully *et al.*, 2012). La familia de las cadherinas juega un papel importante en los procesos de adhesión célula-célula, que es determinante en el proceso de diseminación metastásica de las células de cáncer de mama (Li y Feng, 2011), ya que la invasión va acompañada de cambios en la expresión de algunas cadherinas (Yilmaz y Christofori, 2010). Por un lado, la disminución en los niveles de E-cadherina resulta en la pérdida de adhesión entre las células epiteliales de cáncer de mama y es necesaria para iniciar la diseminación metastásica de las mismas (Wendt *et al.*, 2011). Por otro lado, el aumento en los niveles de N-cadherina permite la adhesión de las células tumorales a las células del estroma y la subsiguiente invasión del estroma (Cavallaro y Christofori, 2004). Después de que las células tumorales pierdan la adherencia entre sí mismas, van a adherirse a los componentes de la MEC, tales como fibronectina, laminina, colágeno, fibrinógeno o vitronectina a través de integrinas (Mego *et al.*, 2010; Li y Feng, 2011). Una vez alterados estos procesos de adhesión, la invasión progresa mediante la degradación proteolítica de los componentes de la MEC, que permite a las células tumorales migrar y penetrar los límites del tejido (Scully *et al.*, 2012).

La degradación de la MEC es llevada a cabo principalmente por metaloproteasas de matriz (MMPs, *matrix metalloproteinases*) y por el sistema activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA, *urokinase plasminogen activator*) (Egeblad y Werb, 2002; Danø *et al.*, 2005). Aunque en la actualidad se conocen 25 miembros de la familia de las MMPs, la mayoría de los estudios se han centrado en el papel de MMP2 y de MMP9 en la degradación de la membrana basal, que es un paso fundamental en el proceso de invasión tumoral (Köhrmann *et al.*, 2009). Por otro lado, cuando el receptor de uPA interacciona con uPA se produce el procesamiento del plasminógeno dando lugar a la activación de la plasmina, que conduce, a su vez, tanto a la degradación de componentes de la MEC como a la activación de MMPs (Riisbro *et al.*, 2002). La inhibición del sistema uPA mediante silenciamiento génico restringe la invasión de las células de cáncer de mama y reduce la expresión de MMP9 (Huang *et al.*, 2010). Además, las integrinas también participan en la regulación de la actividad de MMPs (Li y Feng, 2011). De hecho, las integrinas  $\alpha 5 \beta 1$  y  $\alpha 3 \beta 1$  están implicadas en el aumento de los niveles de MMP9 (Rolli *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2010). Por último, la heparanasa también está involucrada en la degradación de los componentes de la MEC mediante la degradación de proteoglicanos de heparán sulfato (Götte y Yip, 2006).

La migración de las células tumorales por las zonas previamente degradadas puede tener lugar de manera individual o colectiva (McSherry *et al.*, 2007). En los tumores altamente diferenciados, las células de cáncer de mama tienden a migrar de manera colectiva, mientras que lo hacen de manera individual en los tumores poco diferenciados (McSherry *et al.*, 2007). Las células tumorales necesitan la presencia de uniones intercelulares para poder migrar de manera colectiva (Scully *et al.*, 2012). Como resultado, después de que tenga lugar la intravasación, las células van a circular como un émbolo por la sangre o por la linfa, lo que facilita su supervivencia en la circulación (Fidler, 1970). Por otro lado, las células tumorales pueden migrar individualmente de dos formas diferentes (McSherry *et al.*, 2007), que consisten en un movimiento mesenquimal dependiente de proteasas (Friedl y Wolf, 2008; Iwatsuki *et al.*, 2010; Yilmaz y Christofori, 2010) o en un movimiento ameboide independiente de proteasas (Wyckoff *et al.*, 2006; Mierke *et al.*, 2008; Provenzano *et al.*, 2008; Yilmaz y Christofori, 2010). Aunque se ha descrito que las células tumorales utilizan el movimiento mesenquimal predominantemente (McSherry *et al.*, 2007), bajo ciertas circunstancias pueden producirse cambios en el modo de migración celular (Panková *et al.*, 2010).

Las células tumorales que sean capaces de sobrevivir en la circulación van a diseminarse por el cuerpo y alcanzar órganos distales (Hunter *et al.*, 2008; Mego *et al.*, 2010). Se ha postulado que las células tumorales pueden secretar diferentes sustancias que preparan el microambiente de futuros sitios metastásico antes de que tenga lugar la propia diseminación (Psaila *et al.*, 2006). Algunos autores han descrito que las células tumorales inducen la expresión de MMP9 tanto en las células

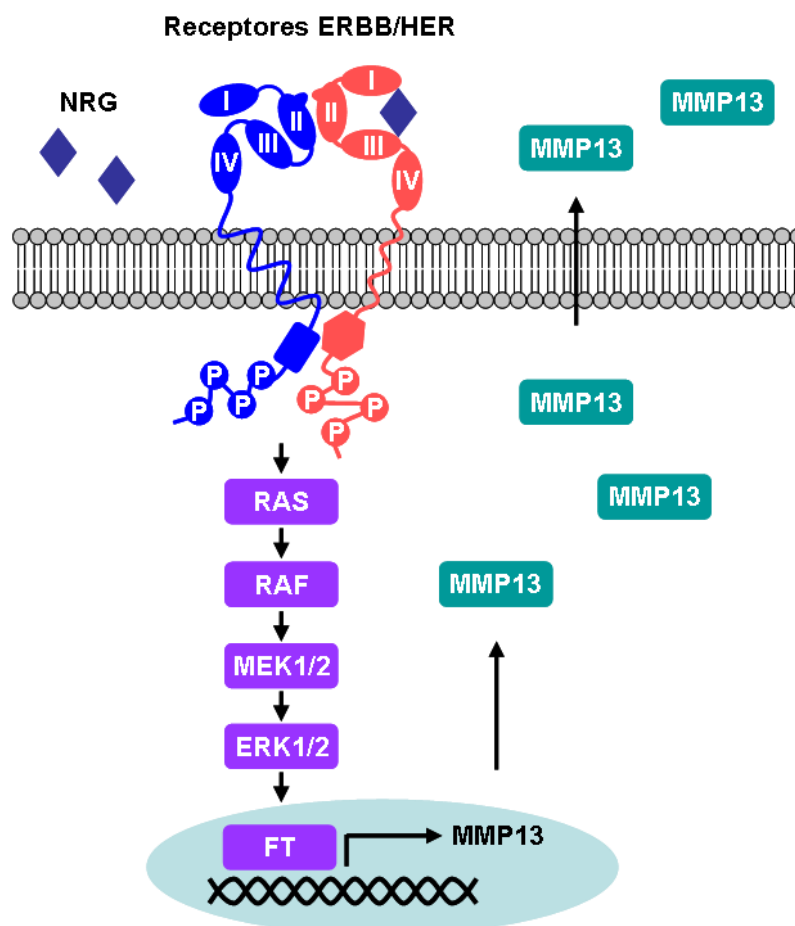
endoteliales como en los macrófagos del pulmón, promoviendo su invasión preferencial en los pulmones (Hiratsuka *et al.*, 2002). En línea con esta observación, las células de cáncer de mama metastatizan preferentemente al hueso y al pulmón, seguidos de otros órganos como el hígado y el cerebro con menor frecuencia (Minn *et al.*, 2005b). De hecho, se han identificado perfiles de expresión génica relacionados con la diseminación metastásica preferencial de las células de cáncer de mama al hueso y al pulmón, que apoyarían la idea de que el proceso metastásico muestra tropismo por ciertos órganos (Kang *et al.*, 2003; Minn *et al.*, 2005a). Otros autores han sugerido la implicación de las quimioquinas en el direccionamiento de las células tumorales hacia los órganos diana. Las células de cáncer de mama expresan el receptor de quimioquinas CXCR4, mientras que su ligando CXCL12 se expresa predominantemente en ganglios linfáticos, pulmón, hígado y hueso (Müller *et al.*, 2001). Los órganos con mayor expresión de CXCL12 se corresponden con lugares comunes de cáncer de mama metastásico (Bruce *et al.*, 1970). La interacción entre CXCR4 y CXCL12 promueve la migración de las células de cáncer de mama a estos sitios comunes de diseminación metastásica (Müller *et al.*, 2001).

Otro aspecto importante en la diseminación metastásica es el establecimiento de la vasculatura tumoral. La angiogénesis juega un papel crítico en la generación de la metástasis y en el subsiguiente crecimiento metastásico (de Castro Junior *et al.*, 2006). Los mecanismos implicados en la estimulación de la angiogénesis por las células tumorales son similares a los que se producen en condiciones fisiológicas normales (Papetti y Herman, 2002). El estrés mecánico, el estrés oxidativo o la hipoxia inducen la expresión de factores proangiogénicos (de Castro Junior *et al.*, 2006), entre los que destaca el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), que, a su vez, va a estimular la angiogénesis resultando en un aumento de la vasculatura tumoral (Hicklin y Ellis, 2005). Además, el VEGF estimula la proliferación, la invasión y la migración de las células endoteliales potenciando la permeabilidad microvascular (Connolly, 1991; Ferrara *et al.*, 1992; Dvorak, 2002).

### **3.1. Implicación de ligandos de los receptores ERBB/HER en la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama**

Algunos estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han conducido a la descripción de un mecanismo implicado en la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama, que depende de la regulación de la producción de MMPs por las NRGs (Seoane *et al.*, 2016). La activación de los receptores ERBB/HER tras la estimulación con NRG desencadena un aumento en la producción de MMP13 (también llamada colagenasa 3), a través de la activación de las quinasas ERK1/2 (Figura 6), que facilita la diseminación de las células de cáncer de mama (Seoane *et al.*, 2016). Asimismo, otros autores han correlacionado la expresión elevada de la metaloproteasa MMP13 en muestras de cáncer

de mama con la detección de células tumorales en los ganglios linfáticos de las pacientes (Zhang *et al.*, 2008; Kotepui *et al.*, 2016). La identificación de este mecanismo implicado en la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama, nos llevó a buscar un compuesto que impidiera su funcionamiento, centrándonos en los aprobados para su uso en la práctica clínica, por ser los más adecuados para facilitar su posterior desarrollo clínico.



**Figura 6. Inducción de la producción de MMP13 por NRG.** La activación de los receptores ERBB/HER tras la estimulación con NRG desencadena un aumento en la producción de MMP13, a través de la activación de las quinasas ERK1/2, que facilita la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama. FT: factor de transcripción.

### 3.2. Dasatinib

Dasatinib (Sprycel®) es un TKI que fue identificado inicialmente como un inhibidor dual de SRC y de ABL (Lombardo *et al.*, 2004). La capacidad de dasatinib para inhibir ABL ha permitido su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y de la leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Lindauer y Hochhaus, 2010; Keating, 2017). Dasatinib también inhibe otras quinasas de la familia SRC (SFKs, *SRC family kinases*) como LCK, HCK, FYN, YES, FGR, BLK, LYN y FRK (Karaman *et al.*, 2008). Además, dasatinib inhibe la actividad de algunos RTKs como c-KIT, c-FMS, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*)  $\alpha$  y  $\beta$ , el receptor con dominio discoidina 1 (DDR1, *discoidin domain*

*receptor 1*) y los receptores de efrinas (Karaman *et al.*, 2008). El amplio espectro de actividad de dasatinib, junto con el papel de varias de sus dianas en la patofisiología de distintos tipos de cáncer, ofrece oportunidades excelentes para su desarrollo en el tratamiento de estos cánceres (Montero *et al.*, 2011a).

Dentro de los efectos antitumorales ejercidos por dasatinib, se ha descrito que inhibe la división celular en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (Finn *et al.*, 2007; Nautiyal *et al.*, 2009; Pichot *et al.*, 2009), gástrico (Okamoto *et al.*, 2010), pancreático (Nagaraj *et al.*, 2010), de cabeza y cuello (Johnson *et al.*, 2005), de pulmón (Johnson *et al.*, 2005) y en leucemias mieloides (Guerrouahen *et al.*, 2010), a través de la inducción de la parada del ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Asimismo, dasatinib promueve la muerte celular en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello (Johnson *et al.*, 2005), de pulmón (Johnson *et al.*, 2005) y pancreático (Nagaraj *et al.*, 2010), causando un aumento en la población subG<sub>0</sub> indicativo de apoptosis. Además, uno de los efectos antitumorales más importantes ejercidos por dasatinib consiste en su capacidad para inhibir la diseminación metastásica (Montero *et al.*, 2011a). En este caso, parece que el mecanismo de acción responsable más relevante reside en el efecto inhibitorio de dasatinib sobre SRC y otras SFKs (Montero *et al.*, 2011a). La tirosina quinasa SRC ha sido involucrada en el proceso metastásico por su capacidad para controlar la morfología celular y algunos procesos celulares tales como la adhesión, la migración y la invasión, a través de la regulación de distintas vías de señalización activadas por debajo de diferentes receptores o componentes del citoesqueleto (Ishizawar y Parsons, 2004). En un modelo ortotópico de cáncer de próstata, el tratamiento con dasatinib inhibe la actividad de SRC junto con la de otras SFKs y reduce tanto el crecimiento tumoral como la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos de los ratones (Park *et al.*, 2008). De la misma manera, se ha descrito que dasatinib reduce el crecimiento y la diseminación metastásica de células de adenocarcinoma pancreático humano (Trevino *et al.*, 2006). Además, en cáncer de mama también se ha observado que dasatinib reduce la formación de metástasis óseas (Zhang *et al.*, 2009). La capacidad de dasatinib para inhibir la diseminación metastásica en diferentes tipos tumorales junto con los datos obtenidos previamente por nuestro grupo, en los que se describe que el tratamiento con dasatinib en células de cáncer de mama sobreexpresoras del receptor HER2 disminuye la activación de las quinasas ERK1/2 (Seoane *et al.*, 2010), posicionan a dasatinib como un buen candidato para bloquear la diseminación metastásica promovida por NRG y mediada por MMP13 en cáncer de mama.

#### **4. RESISTENCIA A TRASTUZUMAB EN CÁNCER DE MAMA**

El hecho de que el receptor HER2 se encuentre sobreexpresado en cáncer de mama y se haya correlacionado con mal pronóstico (Slamon *et al.*, 1987), ha promovido la investigación y el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas contra este receptor (Arteaga *et al.*, 2011). La primera



aproximación terapéutica anti-HER2 exitosa comenzó con el desarrollo de un anticuerpo monoclonal de ratón llamado 4D5, dirigido contra el dominio extracelular del receptor HER2 (Hudziak *et al.*, 1989). Con la intención de poder trasladar el anticuerpo monoclonal de ratón 4D5 a la clínica y reducir su inmunogenicidad en pacientes, el anticuerpo fue humanizado insertando su región determinante de complementariedad en el esqueleto de una inmunoglobulina G1 humana (Carter *et al.*, 1992). El anticuerpo recombinante humanizado anti-HER2 resultante de este esfuerzo se llamó trastuzumab (Herceptin®) y fue desarrollado por la empresa Genentech (San Francisco, Estados Unidos). En concreto, trastuzumab está dirigido contra el subdominio IV de la región extracelular del receptor HER2 (Fendly *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 2003).

El tratamiento con trastuzumab mostró eficacia antitumoral tanto en líneas celulares de cáncer de mama sobreexpresoras de HER2 como en xenoinjertos (Baselga *et al.*, 1998; Pietras *et al.*, 1998) y, además, en ensayos clínicos en mujeres con cáncer de mama HER2 positivo (Baselga *et al.*, 1996; Pegram *et al.*, 1998). En base a su eficacia clínica, trastuzumab fue aprobado en 1998 por la agencia estadounidense para el control de alimentos y medicamentos (FDA, Food and Drug Administration) para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo metastásico, siendo la primera terapia anti-HER2 aprobada por la FDA. Unos años después, en 2006, también fue aprobado para el tratamiento adyuvante del cáncer de mama HER2 positivo en combinación con quimioterapia. La llegada de trastuzumab a la práctica clínica ha mejorado considerablemente la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo. Sin embargo, uno de los principales problemas de la clínica oncológica es la aparición de resistencia al fármaco, que puede ser intrínseca (o primaria) o adquirida (o secundaria), dependiendo de si la paciente no responde al tratamiento desde el inicio o si deja de responder tras un periodo de respuesta inicial, respectivamente.

#### **4.1. Mecanismos de acción de trastuzumab**

Aunque en la actualidad el uso de trastuzumab está muy extendido en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo, los mecanismos responsables de su acción anticancerígena no se conocen totalmente. Se han propuesto varios mecanismos, que se describen a continuación.

**4.1.1. Internalización y degradación de HER2.** Algunos autores han sugerido que trastuzumab disminuye los niveles totales de HER2 en la superficie de las células, al promover su internalización a través de endocitosis y su posterior degradación (Cuello *et al.*, 2001). La disminución de los niveles totales de HER2 va a conducir en último lugar a la reducción de la señalización mediada por el receptor, principalmente a través de MAPK y de PI3K (Nahta, 2012).

**4.1.2. Parada del ciclo celular.** Otros estudios han mostrado que trastuzumab induce parada del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>, que va acompañada de un incremento en los niveles de p27 y,

además, de una disminución de la actividad de ciclina D1 y de CDK2 (Lane *et al.*, 2000; Yakes *et al.*, 2002; Le *et al.*, 2003).

**4.1.3. Inhibición de la vía de PI3K.** Aunque la unión de trastuzumab a su epítipo no puede bloquear la heterodimerización de HER2 con los receptores EGFR o HER3 activados por ligando (Agus *et al.*, 2002), se ha descrito que en ausencia de ligando trastuzumab rompe la heterodimerización de HER2/HER3, inhibiendo parcialmente la señalización a través de PI3K, la cual juega un papel fundamental en la proliferación de las células de cáncer de mama sobreexpresoras de HER2 (Lee-Hoeflich *et al.*, 2008; Junttila *et al.*, 2009).

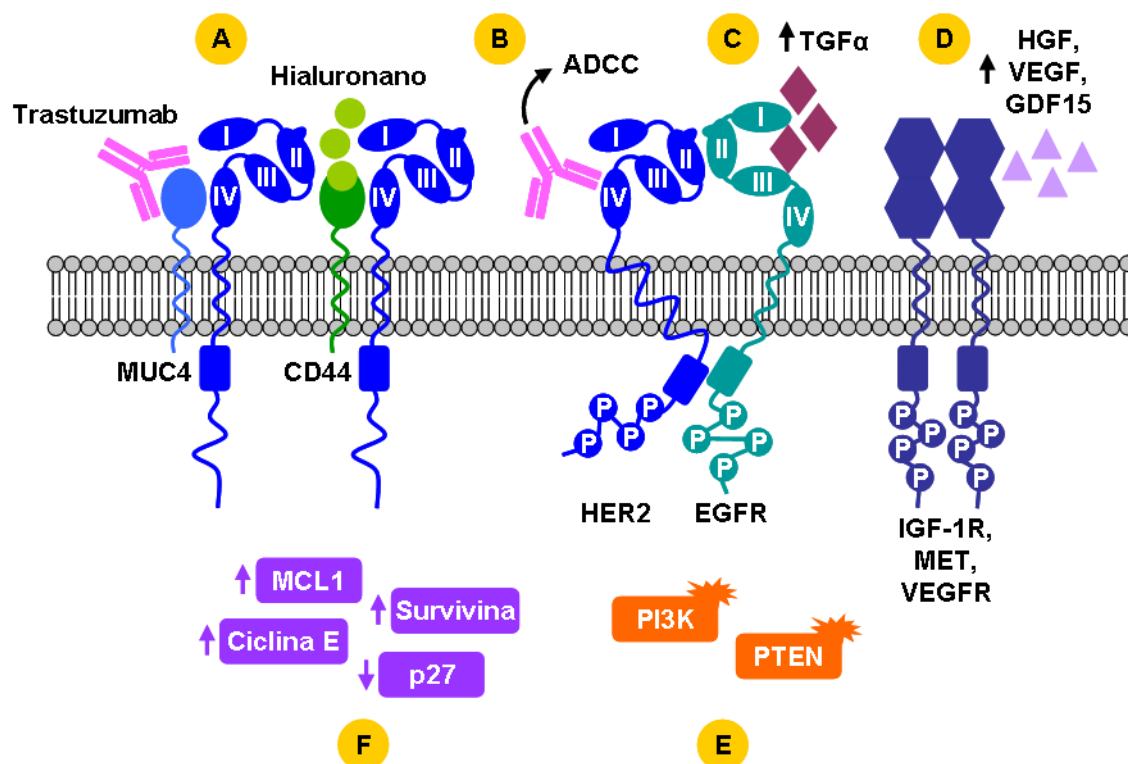
**4.1.4. Inhibición de la angiogénesis.** Trastuzumab modula los efectos de diferentes factores proangiogénicos y antiangiogénicos, induciendo la normalización y la regresión de la vasculatura en un modelo animal de xenoinjerto de células de cáncer de mama sobreexpresoras de HER2 (Izumi *et al.*, 2002). Además, otros autores también han observado una disminución de la densidad de la microvasculatura *in vivo* tras el tratamiento con trastuzumab (Wen *et al.*, 2006). En ambos trabajos los autores observaron una disminución de la producción del VEGF, que estaría mediando la inhibición de la angiogénesis ejercida por trastuzumab (Izumi *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2006).

**4.1.5. Inducción de la respuesta inmune.** Como trastuzumab es un anticuerpo, las células sobreexpresoras de HER2 cubiertas por trastuzumab van a ser reconocidas por células inmunes efectoras específicas induciendo la ADCC (Clynes *et al.*, 2000; Arnould *et al.*, 2006). Este reconocimiento tiene lugar a través de la unión entre la región Fc de trastuzumab y los receptores Fc gamma de las células inmunes efectoras (Clynes *et al.*, 2000; Arnould *et al.*, 2006). Seguramente la evidencia más convincente sobre la contribución de la ADCC en la actividad antitumoral de trastuzumab reside en los estudios realizados en ratones deficientes para los receptores FcγRIII, en los cuales el tratamiento con trastuzumab resulta en una tasa de regresión tumoral menor que la de los ratones que expresan los receptores (Clynes *et al.*, 2000). Aunque es más complicado poder demostrar el papel de la ADCC en la actividad antitumoral de trastuzumab en pacientes con cáncer de mama, algunos autores han observado un aumento en la infiltración de células linfoides en muestras tumorales recogidas después del tratamiento con trastuzumab en comparación con las muestras tumorales sin tratar (Gennari *et al.*, 2004).

## **4.2. Mecanismos de resistencia a trastuzumab**

La mayoría de los mecanismos de resistencia a trastuzumab descritos se han identificado en modelos preclínicos basados principalmente en cultivos celulares. Estos modelos incluyen líneas celulares de cáncer de mama con amplificación de *HER2* que presentan resistencia intrínseca a

trastuzumab o que muestran inicialmente inhibición del crecimiento en respuesta al tratamiento, pero han sido expuestas a dosis de trastuzumab relevantes desde el punto de vista clínico durante un largo periodo de tiempo hasta la adquisición de resistencia al fármaco. En la mayoría de los modelos de resistencia adquirida a trastuzumab, la amplificación de *HER2* y la sobreexpresión del receptor se mantienen al mismo nivel que en las células parentales (Nahta *et al.*, 2004). Utilizando estos modelos se han identificado diversos mecanismos de resistencia a trastuzumab (Figura 7), que se especifican en los siguientes apartados. Como estos mecanismos no están completamente validados en muestras clínicas, un objetivo importante de los estudios sobre mecanismos de resistencia a trastuzumab continúa siendo clarificar cuáles de todos los mecanismos identificados son relevantes desde el punto de vista clínico. Además, el hecho de que la incidencia de resistencia a trastuzumab sea significativamente mayor que la frecuencia de presentación de las anomalías moleculares identificadas indica que deben existir mecanismos de resistencia a trastuzumab adicionales a los actualmente conocidos (Spector y Blackwell, 2009; Scaltriti *et al.*, 2011).



**Figura 7. Representación esquemática de los mecanismos propuestos de resistencia a trastuzumab.** (A) Enmascaramiento del epítipo. (B) Deficiencias en la inducción de la respuesta inmune. (C) Aumento de la señalización a través de otros receptores ERBB/HER (D) Aumento de la señalización a través de otros receptores. (E) Aumento de la señalización por debajo de HER2. (F) Defectos en la apoptosis o en el control del ciclo celular.

**4.2.1. Enmascaramiento del epítipo.** El enmascaramiento del epítipo por otras moléculas puede afectar a la unión de trastuzumab a HER2 y se ha descrito como un mecanismo de resistencia al fármaco. Una de estas moléculas es la glicoproteína asociada a la membrana MUC4, cuya sobreexpresión enmascara el sitio de unión de trastuzumab al interactuar con HER2 y confiere

resistencia al mismo (Price-Schiavi *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2005). El silenciamiento de *MUC4* aumenta la unión de trastuzumab a HER2 y revierte la resistencia al fármaco (Nagy *et al.*, 2005). Por otro lado, la sobreexpresión de una forma procesada de otro miembro de la familia, mucina 1 (*MUC1*), también se ha identificado en un modelo de resistencia a trastuzumab (Fessler *et al.*, 2009). Aunque se ha descrito que esta forma procesada de *MUC1* se asocia con HER2 (Li *et al.*, 2003), también puede homodimerizar desencadenando la señalización a través de vías implicadas en supervivencia y proliferación (Hikita *et al.*, 2008; Mahanta *et al.*, 2008). Por último, la formación del complejo compuesto por hialuronano y por su receptor transmembrana, CD44, también impide el acceso de trastuzumab a HER2 al enmascarar el epítipo y conduce a resistencia al fármaco (Pályi-Krek *et al.*, 2007). El tratamiento de estas células con un inhibidor de las síntesis de hialuronano aumenta la unión de trastuzumab a HER2 y los subsiguientes efectos antitumorales (Pályi-Krek *et al.*, 2007).

**4.2.2. Activación de la señalización a través de otros receptores.** La activación de la señalización a través de otros receptores, pertenecientes a la misma o a distinta familia, también ha sido asociada con la resistencia a trastuzumab. Distintos autores han mostrado que la señalización iniciada por los ligandos de EGFR, HER3 y HER4 puede revertir los efectos antiproliferativos de trastuzumab (Moulder *et al.*, 2001; Motoyama *et al.*, 2002). En un modelo de resistencia a trastuzumab, se ha descrito la expresión elevada de los ligandos de EGFR y de HER3, de manera que el tratamiento de estas células con lapatinib o con otros inhibidores de EGFR consigue restaurar la acción del fármaco (Ritter *et al.*, 2007). Otros autores han mostrado que la sobreexpresión de TGF $\alpha$  confiere resistencia a trastuzumab y que en muestras de pacientes la expresión de TGF $\alpha$  tiene lugar después de la aparición de resistencia al fármaco (Valabrega *et al.*, 2005). Por otro lado, la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1R, *insulin-like growth factor-1 receptor*) o el aumento en los niveles del heterodímero IGF-1R/HER2 han sido descritos como mecanismos de resistencia a trastuzumab, de manera que la inhibición de la señalización a través de IGF-1R o de la actividad tirosina quinasa de HER2 revierten la resistencia a trastuzumab (Lu *et al.*, 2001; Nahta *et al.*, 2005; Nahta *et al.*, 2007; Browne *et al.*, 2011). Asimismo, los niveles elevados de IGF-1R se han correlacionado con una respuesta pobre al tratamiento con trastuzumab en un ensayo clínico (Harris *et al.*, 2007). La señalización a través de MET por sobreexpresión del mismo o por estimulación con su ligando, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *hepatocyte growth factor*), también contribuye a la resistencia a trastuzumab, por lo que el silenciamiento de *MET* o la inhibición de la actividad del receptor mejoran la respuesta a trastuzumab (Shattuck *et al.*, 2008). Además, estos autores han identificado una cohorte de pacientes con sobreexpresión de MET y de su ligando, que no responden a la combinación de quimioterapia y trastuzumab (Shattuck *et al.*, 2008). Otro mecanismo de resistencia a trastuzumab consiste en la

sobreexpresión de la citoquina secretada GDF15, de modo que la inhibición de la actividad tirosina quinasa de HER2 bloquea la señalización mediada por GDF15 y reduce la resistencia a trastuzumab (Joshi *et al.*, 2011). Por último, la sobreexpresión del VEGF también se ha descrito en diferentes modelos de resistencia a trastuzumab, en los que el tratamiento con el anticuerpo monoclonal bevacizumab (Avastin®) dirigido contra el VEGF o la inhibición de la actividad del receptor del VEGF (VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptor*) restauran la sensibilidad al fármaco (du Manoir *et al.*, 2006; Oliveras-Ferraros *et al.*, 2010; Valabrega *et al.*, 2011).

**4.2.3. Aumento de la señalización por debajo de HER2.** Algunos autores han descrito que las mutaciones somáticas de ganancia de función en *PIK3CA*, que es el gen que codifica la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de PI3K, confieren resistencia a trastuzumab a través de la activación constitutiva de la vía (Berns *et al.*, 2007; Ginestier *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2010). En línea con estas observaciones, otros autores han mostrado que el silenciamiento de *PTEN* induce resistencia a trastuzumab (Nagata *et al.*, 2004). Como PTEN funciona como un regulador negativo de la vía de PI3K, la pérdida de función de PTEN también resulta en la activación constitutiva de la vía (Simpson y Parsons, 2001). El tratamiento combinado con trastuzumab y un inhibidor de PI3K revierte la resistencia a trastuzumab generada por el silenciamiento de *PTEN* (Nagata *et al.*, 2004). Asimismo, estos autores han mostrado que la pérdida de PTEN se correlaciona con una peor respuesta de las pacientes al tratamiento con trastuzumab (Nagata *et al.*, 2004).

**4.2.4. Defectos en la apoptosis o en el control del ciclo celular.** Los defectos en la apoptosis o en el control del ciclo celular también están emergiendo como mecanismos de resistencia a trastuzumab. En varios modelos de resistencia intrínseca a trastuzumab se han identificado niveles elevados de la proteína inhibidora de la apoptosis survivina (Oliveras-Ferraros *et al.*, 2011; Valabrega *et al.*, 2011) y de la proteína anti-apoptótica MCL-1 (Valabrega *et al.*, 2011). La disminución de los niveles de survivina mediante silenciamiento génico o el tratamiento de las células con un TKI de amplio espectro, que reduce los niveles de ambas proteínas, restaura la sensibilidad a trastuzumab (Oliveras-Ferraros *et al.*, 2011; Valabrega *et al.*, 2011). Por otro lado, la sobreexpresión de ciclina E se ha identificado en un modelo de resistencia a trastuzumab y se ha mostrado que confiere resistencia al fármaco (Scaltriti *et al.*, 2011). La disminución de los niveles de ciclina E o de su actividad mediante silenciamiento génico o por el tratamiento de las células con inhibidores de CDK2, respectivamente, reduce la proliferación celular y potencia la apoptosis en este modelo (Scaltriti *et al.*, 2011). Además, estos autores han identificado que la sobreexpresión de ciclina E por amplificación génica está asociada con una peor respuesta al tratamiento con trastuzumab en una cohorte de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo (Scaltriti *et al.*, 2011). De manera alternativa, otros autores han

mostrado que la disminución de los niveles de p27 está asociada con la resistencia a trastuzumab y que la sensibilidad al fármaco se puede restaurar mediante la transfección del gen *p27* (Nahta *et al.*, 2004).

**4.2.5. Inducción deficiente de la respuesta inmune.** En último lugar, la inducción deficiente de la respuesta inmune también contribuye a la resistencia a trastuzumab. Como hemos mencionado anteriormente, el tratamiento con trastuzumab de ratones deficientes para los receptores Fc $\gamma$ RIII resulta en una tasa de regresión tumoral menor que la de los ratones que expresan los receptores (Clynes *et al.*, 2000). De manera consistente con este estudio, se han identificado polimorfismos en los genes que codifican los receptores Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIIa en humanos, que están asociados con la respuesta de las pacientes al tratamiento con trastuzumab (Musolino *et al.*, 2008). Los polimorfismos asociados con una mejor respuesta son los que inducen una ADCC más eficientemente (Musolino *et al.*, 2008).

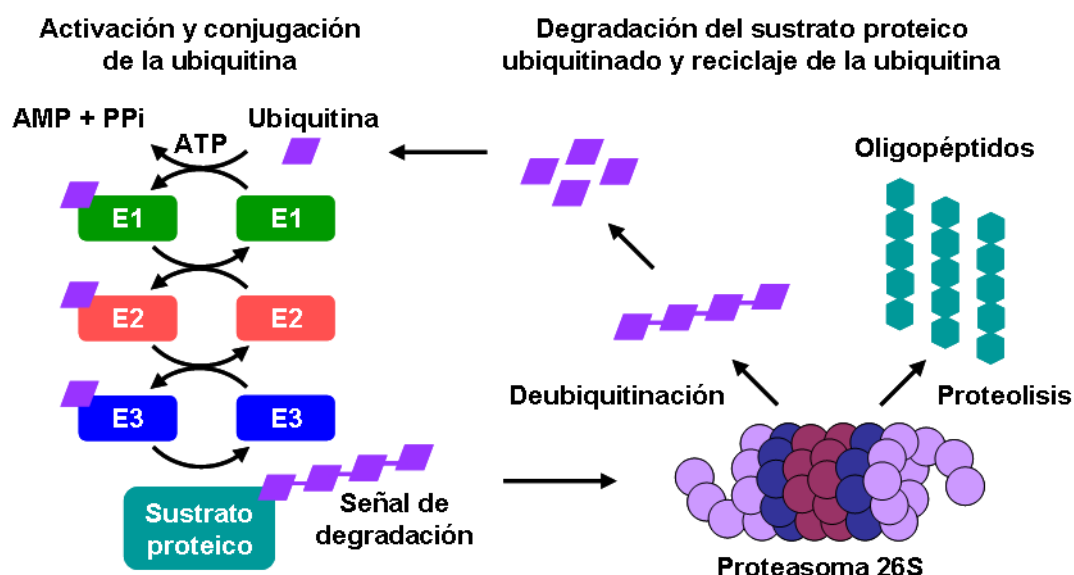
### **4.3. Estrategias terapéuticas para revertir la resistencia a trastuzumab**

A medida que se ha ido avanzando en el desarrollo de otras terapias anti-HER2 y en el conocimiento de los mecanismos de resistencia a trastuzumab, han surgido estrategias terapéuticas potenciales para revertir la resistencia al mismo. Una de estas estrategias propuestas consiste en el cambio de la terapia anti-HER2. Por ejemplo, el tratamiento con lapatinib o con neratinib ha resultado efectivo en pacientes que progresan a trastuzumab (Geyer *et al.*, 2006; Burstein *et al.*, 2010). Asimismo, trastuzumab-emtansina ha mostrado eficacia clínica en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo metastásico con progresión a trastuzumab (Vogel *et al.*, 2009). Otra de las estrategias surgidas radica en la combinación de diferentes terapias dirigidas contra HER2. Por un lado, la combinación de lapatinib y trastuzumab ha resultado ser más efectiva que el tratamiento solo con lapatinib después de la progresión a trastuzumab (Blackwell *et al.*, 2010). Por otro lado, el tratamiento combinado de trastuzumab y pertuzumab también ha resultado ser una estrategia efectiva en pacientes que habían progresado previamente a trastuzumab (Baselga *et al.*, 2010). Además, los inhibidores de la vía de PI3K están emergiendo como estrategia para restaurar la sensibilidad a trastuzumab. Dentro de estos, el inhibidor de mTOR everolimus ha mostrado eficacia clínica en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo metastásico con progresión a trastuzumab (Andre *et al.*, 2010; Jerusalem *et al.*, 2011; Morrow *et al.*, 2011). De manera complementaria a estas estrategias descritas, actualmente se está evaluando en ensayos clínicos el efecto de otros inhibidores tanto de la vía de PI3K como de otras moléculas implicadas en la generación de la resistencia, a la vez que continúa la búsqueda preclínica de nuevas estrategias terapéuticas para revertir la resistencia a trastuzumab. Con tal objetivo, en este trabajo hemos empleado un modelo de resistencia adquirida al fármaco generado previamente por nuestro grupo (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019). Como se describe más adelante, los resultados obtenidos nos llevaron a evaluar la inhibición farmacológica de la vía ubiquitina-proteasoma de degradación de

proteínas como estrategia terapéutica potencial para revertir la resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo.

#### 4.4. Vía ubiquitina-proteasoma de degradación de proteínas

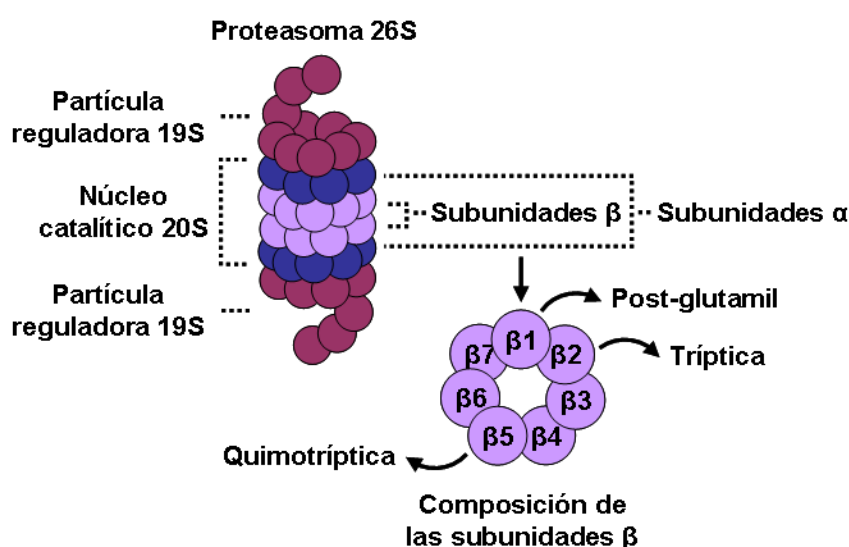
La vía ubiquitina-proteasoma es el principal sistema de degradación de proteínas presente en las células eucariotas (Orlowski y Michaud, 1989; Glickman y Ciechanover, 2002; Schwartz y Ciechanover, 2009). Para asegurar la degradación adecuada de las proteínas dañadas, mal plegadas o que ya no son necesarias, los componentes de esta vía tienen que actuar de manera coordinada en distintos pasos que se pueden dividir en dos etapas sucesivas. La primera etapa consiste en la ubiquitinación o conjugación covalente de múltiples residuos de ubiquitina al sustrato proteico para formar la señal de degradación, mientras que la segunda etapa consiste en la degradación de la proteína ubiquitinada por el proteasoma 26S, junto con la liberación de las moléculas de ubiquitina (Figura 8).



**Figura 8. Representación esquemática de la vía ubiquitina-proteasoma.** La ubiquitina es activada y unida covalentemente al sustrato proteico por la acción sucesiva de las enzimas E1, E2 y E3. Una vez marcado con la señal de degradación, el sustrato proteico va a ser reconocido y degradado por el proteasoma 26S. Las enzimas deubiquitininas se van a encargar de liberar los monómeros de ubiquitina para que puedan ser reutilizados en el marcaje de otros sustratos. AMP: adenosín monofosfato; ATP: adenosín trifosfato; PPi: pirofosfato.

La ubiquitina es una proteína pequeña de 76 aminoácidos altamente conservada en células eucariotas. En el proceso de ubiquitinación intervienen tres reacciones enzimáticas secuenciales. Inicialmente, una enzima activadora de la ubiquitina o E1 se encarga de activar la ubiquitina en una reacción dependiente de ATP mediante la adenilación del extremo C-terminal de la ubiquitina (Hershko *et al.*, 1981) y posterior formación de un enlace tioéster entre el extremo C-terminal de la ubiquitina y la cisteína del centro activo de la E1 (Ciechanover *et al.*, 1981; Hershko *et al.*, 1983). A continuación, la ubiquitina se va a transferir a una enzima conjugadora de la ubiquitina o E2 a través

de la formación de otro enlace tioéster entre la cisteína del centro activo de la E2 y el extremo C-terminal de la ubiquitina, de forma dependiente de ATP (Hershko *et al.*, 1983). La transferencia de la ubiquitina de la E2 al sustrato requiere una tercera enzima ubiquitina ligasa o E3, que lleva unido el sustrato proteico, y se va a producir mediante la formación de un enlace isopeptídico entre el extremo C-terminal de la ubiquitina y una lisina interna del sustrato (Hershko *et al.*, 1986). Después de la conjugación covalente de la primera molécula de ubiquitina al sustrato proteico, se van a añadir nuevas moléculas de ubiquitina sobre la previa hasta formar la señal de degradación, que consiste en un mínimo de cuatro moléculas de ubiquitina unidas entre sí por un enlace isopeptídico entre el extremo C-terminal de una de las moléculas y la lisina 48 de la otra (Thrower *et al.*, 2000). Una vez ubiquitinado, el sustrato proteico va a ser reconocido el proteasoma 26S para su degradación.



**Figura 9. Estructura del proteasoma 26S.** El proteasoma 26S está compuesto por un núcleo catalítico 20S flanqueado por dos partículas reguladoras 19S. El núcleo catalítico está formado a su vez por cuatro anillos de 7 subunidades  $\alpha$  (anillos externos) o  $\beta$  (anillos internos) cada uno. En las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  reside la actividad catalítica del proteasoma 26S.

El proteasoma 26S es un complejo proteico formado por un núcleo catalítico 20S y por dos partículas reguladoras 19S situadas en ambos extremos del núcleo catalítico (Tanaka, 2009) (Figura 9). El núcleo catalítico 20S está formado a su vez por cuatro anillos apilados en forma de barril. Cada uno de los anillos exteriores está compuesto por siete subunidades  $\alpha$ , mientras que cada uno de los interiores está compuesto por siete subunidades  $\beta$ . Dentro de estas últimas, la actividad catalítica del proteasoma reside en las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$ , que presentan actividad post-glutamil (corta después de residuos ácidos), triptica (corta después de residuos básicos) y quimotriptica (corta después de residuos hidrofóbicos), respectivamente (Groll *et al.*, 1999). La partícula reguladora 19S está formada por al menos 19 subunidades y es la responsable del reconocimiento de las proteínas ubiquitinadas susceptibles de degradación. Mientras que algunas de las proteínas ubiquitinadas se unen directamente al proteasoma al interaccionar con determinadas subunidades de la partícula



reguladora 19S implicadas en el reconocimiento del sustrato proteico (Deveraux *et al.*, 1994; Lam *et al.*, 2002; Husnjak *et al.*, 2008), otras son llevadas hasta el proteasoma a través de proteínas adaptadoras, que interaccionan tanto con la partícula reguladora como con la cadena de poliubiquitina del sustrato (Elsasser *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2004). Además, la partícula reguladora también juega un papel importante en el desplegamiento del sustrato y en su translocación al canal del núcleo catalítico (Finley, 2009; Tanaka, 2009). Ambos procesos necesitan energía metabólica para ser llevados a cabo, que se obtiene a partir de la actividad ATPasa de algunas de las subunidades que componen la partícula reguladora. Una vez en el canal del núcleo catalítico, el sustrato va a ser procesado en pequeños péptidos de 3 a 22 residuos de longitud (Nussbaum *et al.*, 1998), que posteriormente serán hidrolizados por proteasas citosólicas inespecíficas hasta aminoácidos que pueden ser reutilizados por la célula (Orlowski y Michaud, 1989; Glickman y Ciechanover, 2002; Schwartz y Ciechanover, 2009). La cadena de poliubiquitina no es degradada por el proteasoma, sino que es desprendida del sustrato por la única subunidad de la partícula reguladora 19S que posee actividad deubiquitinasa intrínseca (Tanaka, 2009). Después de ser liberada, las enzimas deubiquitinases se van a encargar de separar las moléculas de ubiquitina en monómeros para que puedan ser reutilizadas en el marcaje de otros sustratos proteicos (Kawakami *et al.*, 1999).

#### 4.5. Bortezomib

El inhibidor del proteasoma bortezomib (Velcade®) es un análogo modificado del ácido dipeptidil borónico que se une de forma reversible y con alta afinidad a la subunidad  $\beta 5$  del núcleo catalítico 20S (Adams *et al.*, 1999; Berkers *et al.*, 2005; Groll *et al.*, 2006). Bortezomib representa el primer inhibidor del proteasoma empleado en la práctica clínica y está aprobado para el tratamiento tanto del mieloma múltiple como del linfoma de células del manto (Grosicki *et al.*, 2014; Hambley *et al.*, 2016). Aunque los mecanismos de acción de bortezomib junto con sus efectos clínicos se han estudiado de manera más extensiva en mieloma múltiple y en otros cánceres hematológicos (Chauhan *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2003; Hideshima *et al.*, 2004; Navas *et al.*, 2006; Kojima *et al.*, 2007; Minderman *et al.*, 2007; Podar *et al.*, 2007; Tai *et al.*, 2007), el efecto antitumoral ejercido por bortezomib se ha demostrado también en una amplia variedad de líneas celulares tumorales y en modelos animales de tumores sólidos, entre los que se encuentran el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Sunwoo *et al.*, 2001; Van Waes *et al.*, 2005; Duan *et al.*, 2007), el carcinoma renal (An *et al.*, 2004), el cáncer de pulmón no microcítico (Yang *et al.*, 2004), el cáncer colorrectal (Yu *et al.*, 2003), el cáncer de páncreas (Nawrocki *et al.*, 2002), el cáncer de próstata (Williams *et al.*, 2003) y el cáncer de mama (Cardoso *et al.*, 2006).

A pesar del éxito de bortezomib en el tratamiento de distintos tipos de cánceres hematológicos, en tumores sólidos la eficacia clínica de bortezomib como agente único es limitada

(Huang *et al.*, 2014). Sin embargo, distintos estudios preclínicos y clínicos han mostrado que en combinación con otros fármacos, bortezomib presenta una actividad antitumoral importante, sugiriendo un efecto aditivo o sinérgico en tumores sólidos (Cardoso *et al.*, 2004; Roeten *et al.*, 2018). En cáncer de mama en concreto bortezomib ha mostrado este efecto aditivo o sinérgico en combinación con doxorubicina (Thornton *et al.*, 2011), doxorubicina liposomal (Orlowski y Dees, 2003), trastuzumab (Cardoso *et al.*, 2006) y docetaxel (Awada *et al.*, 2008).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



## **HIPÓTESIS**

La familia de receptores tirosina quinasa ERBB/HER y sus ligandos juegan un papel importante en la oncogénesis y en la progresión tumoral del cáncer de mama. El desarrollo de terapias dirigidas contra estos receptores ha mejorado tanto el pronóstico como la calidad de vida de las pacientes. Sin embargo, la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama y la generación de resistencias a los tratamientos empleados en la práctica clínica son los responsables de que esta enfermedad todavía sea incurable. La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que puedan bloquear o revertir estas situaciones es fundamental para aumentar la supervivencia de las pacientes.

## **OBJETIVO GENERAL**

Teniendo en cuenta esta hipótesis, en el presente proyecto de tesis doctoral nos planteamos como objetivo general la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer de mama que permitieran bloquear la diseminación metastásica o revertir la resistencia a los tratamientos empleados.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Encontrar una estrategia terapéutica que pudiera inhibir la producción de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación con NRG para bloquear la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama.
2. Identificar una estrategia terapéutica que pudiera revertir la resistencia a trastuzumab en cáncer de mama HER2 positivo.

La sección de resultados de esta tesis doctoral está dividida en dos capítulos. En cada capítulo se aborda cada uno de los objetivos específicos.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. REACTIVOS GENERALES Y FÁRMACOS

Los reactivos generales y los fármacos empleados en este trabajo se recogen agrupados por su procedencia en la tabla 3. En general, todos los fármacos empleados *in vitro* se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración mil veces superior a la dosis de tratamiento indicada en cada experimento. Únicamente para los ensayos *in vivo*, dasatinib se disolvió en ácido tartárico 25 mM.

**Tabla 3. Reactivos generales y fármacos empleados en este trabajo**

Reactivo o fármaco	Procedencia
Acetato sódico (ref. 106268), ácido acético (ref. 100063), ácido clorhídrico fumante al 37 % (ref. 100317), carbonato sódico (ref. 106392), dimetilformamida (ref. 103053), DMSO (ref. 802912), dodecilsulfato sódico (SDS, <i>sodium dodecyl sulfate</i> ; ref. 822050), glicerol (ref. 104092), NaCl (ref. 106404) y tris(hidroximetil)aminometano (Tris; ref. 108382)	Merck (Darmstadt, Alemania)
Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES; ref. 3375), ácido tartárico (ref. T109), albúmina de suero bovino (BSA, <i>bovine serum albumin</i> ; ref. A7906), azul de bromofenol (ref. B8026), $\beta$ -glicerofosfato (ref. 50020), $\beta$ -mercaptoetanol (ref. M7154), $\text{CaCl}_2$ (ref. C1016) 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS; ref. 226947), cristal violeta (ref. C3886), fluoruro sódico (ref. S7920), luminol (ref. A8511), $\text{MgCl}_2$ (ref. M8266), Nonidet <sup>TM</sup> P-40 (ref. 74385), ortovanadato sódico (ref. S6508), paraformaldehído (ref. 158127), peróxido de hidrógeno (ref. H1009), <i>p</i> -iodofenol (ref. I10201), sacarosa (S0389), Triton <sup>TM</sup> X-100 (ref. X100), Tween® 20 (ref. P1379) y xileno cianol (ref. X4126)	Sigma-Aldrich (San Luis, Estados Unidos)
Ampicilina (ref. 11257), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; ref. 15700), aprotinina (ref. 11388), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> ; ref. 20203), leupeptina (ref. 18413) y pepstatina (ref. 20037)	USB (Cleveland, Estados Unidos)
Antibióticos (penicilina/estreptomina, ref. 15140122), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Dulbecco's <i>modified Eagle's medium</i> ; ref. 41966-029), medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (ref. 21875-034), suero fetal bovino (FBS, <i>fetal bovine serum</i> ; ref. 10270106) y tripsina-EDTA (ref. 25200056)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Estados Unidos)
BIX02189 (ref. S1531), bortezomib (ref. S1013), carfilzomib (ref. S2853) y trametinib (ref. S2673)	Selleck Chemicals (Houston, Estados Unidos)
CB-5083 (ref. HY-12861), P5091 (ref. HY-15667), serdemetan (ref. HY-12025) y VLX1570 (ref. HY-12471)	MedChemExpress (Monmouth Junction, Estados Unidos)
Dasatinib (ref. D-3307)	LC Laboratories (Woburn, Estados Unidos)
Glicina (ref. 16507)	Affymetrix (Santa Clara, Estados Unidos)
H <sub>2</sub> O Milli-Q®	Merck Millipore (Burlington, Estados Unidos)
MG132 (ref. 474790) y PP2 (ref. 529573)	Calbiochem (San Diego, Estados Unidos)
Neuregulina 1 $\beta$ 2 (NRG; ref. CYT-407)	Prospec (Rehovot, Israel)
Tampón fosfato salino (PBS, <i>phosphate buffered saline</i> ), bacterias competentes <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ , medio Luria-Bertani (LB) y placas LB-agar con 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina	Servicio de limpieza, esterilización y cocina de medios del CIC-IBMCC (Salamanca, España)

## 2. ANTICUERPOS

Las características principales de los anticuerpos empleados para el desarrollo de este trabajo, así como su procedencia, se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4. Anticuerpos empleados en este trabajo**

Anticuerpo	Aplicación	Fuente	Procedencia
<i>Anticuerpos primarios</i>			
Anti-CSK (C74C1)	WB: 1/5.000	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technologies (Beverly, Estados Unidos); ref. 4980
Anti-ciclina B1 (GNS1)	WB:1/5.000	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Estados Unidos); ref. sc-245
Anti-caspasa 3	WB:1/10.000	Monoclonal de ratón	BD Biosciences (San José, Estados Unidos); ref. 610322
Anti-caspasa 3 procesada (Asp175) (5A1E)	WB:1/1.000	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 9664
Anti-caspasa 7 (D2Q3L)	WB:1/1.000	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 12827
Anti-caspasa 8 (1C12)	WB:1/1.000	Monoclonal de ratón	Cell Signaling Technologies; ref. 9746
Anti-caspasa 9	WB:1/1.000	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 9502
Anti-ERK1/2 (C-14)*	WB: 1/3.000	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology; ref. sc-154
Anti-ERK5	IP: 2 $\mu$ L	Policlonal de conejo	Producido en el laboratorio (Esparís-Ogando <i>et al.</i> , 2002)
Anti-fosfo-AKT (Ser473)	WB: 1/5.000	Monoclonal de ratón	BD Biosciences; ref. 560397
Anti-fosfo-CDK1 (Y15)	WB: 1/2.000	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 9111
Anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (E10)	WB: 1/3.000	Monoclonal de ratón	Cell Signaling Technologies; ref. 9106
Anti-fosfo-ERK5	WB: 1/3.000	Policlonal de conejo	Producido en el laboratorio (Esparís-Ogando <i>et al.</i> , 2002)
Anti-fosfo-MEK1/2 (Ser217/221)	WB: 1/7.500	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 9121
Anti-fosfo-MEK5	WB: 1/2.500	Policlonal de conejo	Producido en el laboratorio (Sánchez-Fdez <i>et al.</i> , 2019)
Anti-fosfo-c-RAF (Ser259)	WB: 1/4.000	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 9421
Anti-fosfo-S6 (Ser240/244)	WB: 1/10.000	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 2215
Anti-fosfo-SRC <i>family</i> (Tyr416)	WB: 1/4.000	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 2101
Anti-fosfo-Tyr (PY99)	WB: 1/10.000	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology; ref. sc-7020
Anti-FYN	WB: 1/5.000	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 4023
Anti-GAPDH (FL-335)*	WB: 1/20.000	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology; ref. sc-25778
Anti-HER2 (Ab3)	WB: 1/10.000	Monoclonal de ratón	Calbiochem; ref. OP15
Anti-HER2 (4D5)	IP: 2 $\mu$ g	Monoclonal de ratón	Cedido por John Mendelsohn (MD Anderson Cancer Center, Houston, Estados Unidos)

Anti-HER3	IP: 1 $\mu$ L WB: 1/5.000	Policlonal de conejo	Producido en el laboratorio (Sánchez-Martín y Pandiella, 2012)
Anti-LCK (D88) XP®	WB: 1/5.000	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 2984
Anti-LYN (C13F9)	WB: 1/5.000	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 2796
Anti-MEK5	IP: 2,5 $\mu$ L	Policlonal de conejo	Producido en el laboratorio (Sánchez-Fdez <i>et al.</i> , 2019)
Anti-MMP13 (H-230)*	IP: 1 $\mu$ g WB: 1/1.000	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology; ref. 30073
Anti-NRG	IP: 3 $\mu$ L WB: 1/4.000	Policlonal de conejo	Producido en el laboratorio (Montero <i>et al.</i> , 2000)
Anti-RAS	WB: 1/1.000	Monoclonal de ratón	Cedido por Eugenio Santos (CIC-IBMCC)
Anti-SRC (32G6)	WB: 1/5.000	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 2123
Anti-SHC	IP: 2 $\mu$ L WB: 1/4.000	Policlonal de conejo	Merck Millipore; ref. 06-203
Anti-WEE1 (H-300)*	WB: 1/1.000	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology; ref. 9037
Anti-YES	WB: 1/10.000	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technologies; ref. 3201
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
Anti-conejo-HRP	WB: 1/20.000	Policlonal de cabra	Bio-Rad Laboratories (Hercules, Estados Unidos); ref. 170-6515
Anti-conejo-HRP específico de cadena ligera	WB: 1/5.000	Monoclonal de ratón	Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, Estados Unidos); ref. 211-032-171
Anti-ratón-HRP	WB: 1/10.000	Policlonal de oveja	GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, Estados Unidos); ref. NA931

\* Los anticuerpos policlonales de conejo de Santa Cruz Biotechnology han sido descatalogados. WB: Western blot; IP: inmunoprecipitación; HRP: peroxidasa de rábano.

### 3. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

#### 3.1. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas para la realización de este trabajo son de origen humano y sus principales características se detallan en la tabla 5. Las líneas celulares BT474, HEK293T, MCF7, MDAMB231, SKBR3 y T47D fueron compradas a la colección americana de cultivos tipo (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Estados Unidos). Las líneas celulares BT549 y HCC3153 fueron cedidas por Jesús Pérez-Losada (CIC-IBMCC). La línea celular BTRH, que se caracteriza por ser resistente al anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2 trastuzumab, fue generada previamente en el laboratorio a partir de la línea celular parental BT474 mediante exposición prolongada al fármaco (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019). Las células MCF7 que expresan tanto el gen codificante de la isoforma  $\alpha 2c$  de la NRG1 de rata como el gen indicador de la luciferasa también fueron generadas previamente en el laboratorio (Yuste *et al.*, 2005; Seoane *et al.*, 2016).

**Tabla 5. Líneas celulares empleadas en este trabajo**

Línea celular	Tejido	Receptores (ER, PR y HER2)	Subtipo clínico de cáncer de mama
BT474	Carcinoma ductal de mama	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 sobreexpresado	HER2 positivo
BT549	Carcinoma ductal de mama	ER <sup>-</sup> /PR <sup>-</sup> /HER2 <sup>-</sup>	Triple negativo
BTRH	Carcinoma ductal de mama	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 sobreexpresado	HER2 positivo
HCC3153	Carcinoma ductal de mama	ER <sup>-</sup> /PR <sup>-</sup> /HER2 <sup>-</sup>	Triple negativo
HEK293T	Riñón embrionario	-	-
MCF7	Adenocarcinoma de mama	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 bajo	Receptor hormonal positivo
MCF7-NRGα2c-Luc	Adenocarcinoma de mama	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 bajo	Receptor hormonal positivo
MDAMB231	Adenocarcinoma de mama	ER <sup>-</sup> /PR <sup>-</sup> /HER2 <sup>-</sup>	Triple negativo
SKBR3	Adenocarcinoma de mama	ER <sup>-</sup> /PR <sup>-</sup> /HER2 sobreexpresado	HER2 positivo
T47D	Carcinoma ductal de mama	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 bajo	Receptor hormonal positivo

### 3.2. Descongelación y mantenimiento de las líneas celulares

El cultivo de las líneas celulares se realizó a partir de células congeladas en viales criogénicos en tanques de nitrógeno líquido. Los viales se calentaron en un baño termostático Grant SUB14 (Grant Instruments, Shepreth, Inglaterra) a 37 °C durante 2 minutos para su descongelación y el contenido de cada vial se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 mL (Corning, Corning, Estados Unidos; ref. 352070), que contenía 5 mL del medio de cultivo correspondiente, indicado en la tabla 6. Los tubos se centrifugaron a 219 x g a temperatura ambiente durante 3 minutos en una centrífuga Eppendorf 5810 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y las células sedimentadas se resuspendieron en 5 mL de medio de cultivo para sembrarlas en placas de cultivo de 100 mm estériles (Corning; ref. 430167), que contenían otros 5 mL de medio. Las placas se mantuvieron en una incubadora HERAcell® 150 (Heraeus, Hanau, Alemania) a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub> hasta que el cultivo celular alcanzó una confluencia del 80-90 % y se realizó el subcultivo del mismo. El seguimiento del cultivo celular se realizó diariamente con un microscopio invertido Zeiss Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania). En primer lugar, se retiró el medio de cultivo de la placa y las células adheridas se lavaron con PBS (NaCl 137 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,98 mM; KCl 2,68 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM) estéril para eliminar los restos de medio. Seguidamente, las células se incubaron con 1 mL (por placa) de una solución de 0,25 % de tripsina-EDTA 1 mM durante 2 minutos a 37 °C para producir su disociación de la placa y entre ellas. Una vez disociadas, el efecto de la tripsina se neutralizó añadiendo medio de cultivo y un volumen determinado de la suspensión celular resultante se transfirió a placas de 100 mm nuevas acorde con la dilución de subcultivo requerida para cada línea celular, que se recoge en la tabla 6. Las placas se

completaron con medio hasta un volumen final de 8-10 mL y se volvieron a mantener en la incubadora de cultivos celulares. Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia del 80-90 %, se realizó de nuevo el subcultivo del mismo. Con el objetivo de renovar el cultivo celular, periódicamente se descongelaron nuevos viales criogénicos conservados en tanques de nitrógeno líquido, procediendo como se indica en este apartado. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica Telstar Bio-II-A o Telstar BioULTRA (Azbil Telstar Technologies, Tarrasa, España), al igual que cualquier manipulación de las líneas celulares en cultivo que se describa en los siguientes apartados.

**Tabla 6. Condiciones de cultivo de las líneas celulares empleadas en este trabajo**

Línea celular	Medio de cultivo	Dilución de subcultivo
BT474	DMEM con alta concentración de glucosa (4,5 g/L), L-glutamina 4 mM y piruvato sódico 1 mM suplementado con antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL) y 10 % de FBS	1:4
BT549	RPMI 1640 con L-glutamina 2 mM suplementado con antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL) y 10 % de FBS	1:8
BTRH	El mismo que para la línea celular BT474	1:4
HCC3153	El mismo que para la línea celular BT549	1:4
HEK293T	DMEM con alta concentración de glucosa (4,5 g/L), L-glutamina 4 mM y piruvato sódico 1 mM suplementado con antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL) y 5 % de FBS	1:10
MCF7	El mismo que para la línea celular BT474	1:4
MCF7-NRGα2c-Luc	El mismo que para la línea celular BT474	1:4
MDAMB231	El mismo que para la línea celular BT474	1:10
SKBR3	El mismo que para la línea celular BT474	1:3
T47D	El mismo que para la línea celular BT474	1:4

### 3.3. Preservación de las líneas celulares

El cultivo celular en fase de crecimiento exponencial se congeló cuando fue necesaria su conservación. Para ello, las células se disociaron según se indica en el apartado anterior y la suspensión celular resultante se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 mL, que se centrifugó a 219 x g a temperatura ambiente durante 3 minutos en una centrífuga Eppendorf 5810 R. Las células sedimentadas se resuspendieron en 1 mL de medio de congelación frío, que se preparó adicionando 10 % de DMSO como agente crioprotector al medio de cultivo, y se transfirieron a un vial criogénico (Sarsdedt, Nümbrecht, Alemania; ref. 72.380.992). Los viales se mantuvieron a -80 °C durante 24 horas y se transfirieron a tanques de nitrógeno líquido, donde se almacenaron a largo plazo.

#### **4. RECUESTO CELULAR**

Para llevar a cabo los experimentos a una densidad celular determinada fue necesario realizar previamente el recuento de las células en cultivo. Las células se disociaron como se indica en el apartado 3.2 y se resuspendieron en medio de cultivo (15-30 mL dependiendo de la confluencia del cultivo). A continuación, se recogieron 500  $\mu$ L de la suspensión celular en un vaso de poliestireno (Beckman Coulter Life Sciences, Indianápolis, Estados Unidos; ref. A35473) y se diluyeron en 9,5 mL de ISOTON® II (Beckman Coulter Life Sciences; ref. 8546719). El recuento de las células se realizó en un contador de partículas Beckman Coulter Z1 Particle Counter (Beckman Coulter Life Sciences), que detectaba partículas con un tamaño comprendido entre los 8 y los 24  $\mu$ m. Para cada muestra se realizaron tres lecturas y el número de células en cultivo se calculó como la media de los triplicados multiplicada por el factor de dilución correspondiente utilizado (20).

#### **5. TRATAMIENTO Y ESTIMULACIÓN CELULAR**

Para los estudios sobre dasatinib, cuando el cultivo de las líneas celulares BT474, BT549, HCC3153, MCF7, MDAMB231, SKBR3 y T47D en placas de 100 mm alcanzó un 70-80 % de confluencia, las células se privaron de suero. Para ello, se retiró el medio de cultivo de la placa y las células adheridas se lavaron con PBS estéril tres veces, antes de incubarlas con medio de cultivo suplementado únicamente con antibióticos. Después de 16-18 horas, las células se trataron con dasatinib 1  $\mu$ M durante 3 horas o con 0,1 % de DMSO (vehículo control). Además, las células MCF7 fueron tratadas con otras concentraciones de dasatinib (10, 25, 50, 100, 250 o 500 nM), con trametinib 1  $\mu$ M, con BIX02189 10  $\mu$ M o con PP2 20  $\mu$ M durante el mismo tiempo. Después de los tratamientos, las células se estimularon o no con NRG 10 nM durante los tiempos indicados en cada experimento. Las células MCF7, que se habían sometido al silenciamiento génico según se indica en el apartado 7, se privaron de suero igualmente y se estimularon o no con NRG 10 nM durante los tiempos indicados en los experimentos. Las células MCF7-NRG $\alpha$ 2c-Luc se privaron de suero del mismo modo y se trataron con dasatinib 1  $\mu$ M durante 24 horas o con 0,1 % de DMSO. Para los estudios sobre borteomib, las células BT474 y BTRH se sembraron en placas de 100 mm a una densidad de  $3 \times 10^6$  células por placa y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión a la placa. Una vez adheridas, las células se trataron directamente con borteomib 50 nM durante 12, 24, 36 y 48 horas o con 0,1 % de DMSO (vehículo control). Transcurridos estos tiempos de tratamiento o de estimulación, las células se procesaron para realizar el análisis de proteínas o de la expresión génica según se describe más adelante. Los tratamientos y la estimulación con NRG tuvieron lugar en la incubadora de cultivos celulares en las condiciones descritas anteriormente.

## 6. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

La adquisición de imágenes de las células BT474 y BTRH tratadas se realizó mediante microscopía de campo claro utilizando un microscopio EVOS Fluid Cell Imaging Station (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) con un objetivo 20X. Las imágenes son representativas de un experimento que se repitió tres veces.

## 7. SILENCIAMIENTO GÉNICO EN LAS LÍNEAS CELULARES

### 7.1. Producción de lentivirus

Para la producción de lentivirus se utilizaron las células HEK293T y se eligió un sistema de tercera generación que requiere el empleo de cuatro plásmidos, entre los que se encuentran repartidos los componentes necesarios para la producción de lentivirus: un plásmido lentiviral que porta el inserto de interés, dos plásmidos empaquetadores y un plásmido para la envuelta. Las células HEK293T se sembraron en placas de 100 mm a una densidad de  $2,5 \times 10^6$  células por placa y, después de 24 horas, se co-transfectaron con 4  $\mu$ g de cada uno de los siguientes plásmidos (Addgene, Cambridge, Estados Unidos): pMDLg/pRRE (contiene los genes *gag* y *pol*, los cuales codifican las proteínas estructurales y enzimas retrovirales fundamentales para el empaquetamiento del ARN genómico en la partícula viral y, además, contiene la región RRE, que es el sitio de unión para la proteína Rev), pRSV-Rev (codifica la proteína Rev que facilita la exportación del ARN mensajero del núcleo al citoplasma) y pMD2.G (codifica la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, conocida como VSV), junto con 8  $\mu$ g del plásmido lentiviral pLKO.1, que contenía una horquilla pequeña de ARN (shRNA, *short hairpin RNA*) (Moffat *et al.*, 2006) que no estaba dirigida contra ningún gen humano (sh-Control) o que estaba dirigida contra *SRC*, *YES1* o *CSK* (GE Dharmacon, Lafayette, Estados Unidos). La co-transfección se realizó utilizando el reactivo de transfección jetPEI® (Polyplus-transfection, Illkirch, Francia; ref. 101-10N). Por un lado, se mezclaron todos los plásmidos en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (Daslab, Barberá del Vallés, España; ref. 175508) con 250  $\mu$ L de NaCl 150 mM (proporcionado con el jetPEI®). Por otro lado, se mezclaron 40  $\mu$ L de jetPEI® con 250  $\mu$ L de NaCl 150 mM en otro tubo. A continuación, se transfirió la mezcla de jetPEI® a la de ADN y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se adicionó la mezcla resultante gota a gota sobre el medio de cultivo de las células HEK293T, que se encontraban a una densidad del 70-80 %. A las 24 horas de la transfección, se reemplazó el medio de las células HEK293T por el de las células MCF7. Después de 24 horas, se recogió el medio que contenía los lentivirus que se habían producido y se filtró con filtros Millex®-HV de membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, *polyvinylidene difluoride*) de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro (Merck Millipore; ref. SLHV033RB) para eliminar las células presentes. El medio de cultivo

filtrado se empleó para transducir las células MCF7 como se indica a continuación o se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  si la transducción celular no se llevó a cabo seguidamente.

## 7.2. Transducción celular

Las células MCF7 se sembraron en placas de 100 mm a una densidad de  $2 \times 10^6$  células por placa y se incubaron durante 24 horas para permitir su adhesión a la placa. Una vez adheridas, se descartó su medio de cultivo para incubarlas con el medio filtrado de las células HEK293T, al que se le habían añadido  $6\text{ }\mu\text{g/mL}$  de polibreno (Sigma-Aldrich; ref. H9268) para aumentar la eficiencia de la transducción celular (Davis *et al.*, 2002). Después de 8 horas de incubación con los lentivirus, se reemplazó el medio de las células MCF7 por medio fresco y se cultivaron durante 48 horas para permitir un silenciamiento génico eficiente. Pasado este tiempo, las células infectadas se seleccionaron con  $3\text{ }\mu\text{g/mL}$  de puomicina (Sigma-Aldrich; ref. P8833) durante 48 horas (el plásmido pLKO.1 contiene el gen de resistencia a puomicina bajo el promotor humano *U6*). Para evaluar la eficacia del silenciamiento génico, los niveles de proteína de SRC, YES o CSK de las células seleccionadas se analizaron por Western blot (WB) como se indica en el siguiente apartado. Se probaron un mínimo de cinco secuencias diferentes de shRNA dirigidas contra *SRC*, *YES1* o *CSK* y se seleccionaron aquellas dos que produjeron mayor silenciamiento para llevar a cabo la estimulación de las células con NRG o los experimentos de migración e invasión celular. Solo se muestran resultados representativos utilizando una secuencia de shRNA para cada gen.

## 8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 8.1. Extracción y cuantificación de proteínas

La extracción de proteínas celulares se realizó mediante un método químico de ruptura celular o lisis empleando el detergente no iónico Nonidet<sup>TM</sup> P-40. Las placas de 100 mm con las células tratadas se depositaron en hielo y todo el proceso de extracción subsiguiente se realizó también en hielo para mantener la estabilidad de las proteínas. Después de descartar el medio de cultivo, las células adheridas se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron incubándolas con 1 mL (por placa) de tampón de lisis frío (1 % de Nonidet<sup>TM</sup> P-40; 10 % de glicerol; EDTA 50 mM; NaCl 140 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 7,0; aprotinina  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ; leupeptina  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ; pepstatina  $1\text{ }\mu\text{M}$ ; PMSF 1 mM;  $\beta$ -glicerofosfato 25 mM; fluoruro sódico 10 mM; ortovanadato sódico 1 mM) durante 15 minutos en hielo. El lisado celular se recogió con ayuda de un raspador celular (Sarsdedt; ref. 83.1830), se pasó a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se clarificó mediante centrifugación a  $10.000 \times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos en una centrífuga Eppendorf 5417 R (Eppendorf). El sobrenadante se recogió en otro tubo y la concentración de proteína fue determinada mediante el método del ácido bicinonínico (BCA, *bicinchoninic acid*) con el kit comercial Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific; ref. 23225). En una placa de



96 pocillos (Corning; ref. 353072) se realizó una dilución 1:5 del extracto proteico, para lo cual se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q® y 5  $\mu\text{L}$  del extracto por pocillo y por triplicado, a los que se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo (50 partes del reactivo A con una parte del reactivo B). La placa se colocó en agitación durante 1 minuto a temperatura ambiente protegida de la luz en un agitador orbital Boeco OS 20 (Boeckel, Hamburgo, Alemania) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos en la incubadora de cultivos celulares. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y la absorbancia se leyó a 570 nm en un espectrofotómetro Ultra Evolution 1536 (Tecan, Männedorf, Suiza). En la misma placa se prepararon también soluciones patrón de BSA en un rango de concentración de 0 a 2.000  $\mu\text{g/mL}$  siguiendo las instrucciones del fabricante para obtener la recta patrón. Los valores de absorbancia media obtenidos de cada extracto proteico se interpolaron en esta recta patrón para obtener los valores de concentración de proteína de los mismos. Una vez cuantificados, se prepararon las muestras para llevar a cabo la detección de proteínas utilizando el método de WB. La mayoría de las proteínas se detectaron directamente en extracto proteico, mezclando el volumen correspondiente a la cantidad de proteína necesaria, en función de la proteína objeto de estudio, con el mismo volumen de tampón de carga 2X (0,05 % de azul de bromofenol; 4 % de SDS; 20 % de glicerol; 2 % de  $\beta$ -mercaptoetanol; Tris-HCl 100 mM, pH 6,8) en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Las muestras fueron sometidas a electroforesis según se describe más adelante o guardadas a -20 °C si la electroforesis no se realizó a continuación. Sin embargo, para detectar algunas proteínas o sus formas fosforiladas en residuos de tirosina fue necesario enriquecer la muestra en dicha proteína mediante inmunoprecipitación (IP).

## 8.2. IP

Las proteínas MMP13, HER2, HER3, SHC, MEK5, ERK5 y NRG fueron inmunoprecipitadas de los extractos proteicos antes de ser analizados sus niveles o su fosforilación mediante WB. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se incubaron 2 mg de extracto proteico con 60  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 (0,6 mg) de proteína A-Sefarosa™ CL-4B (GE Healthcare, Little Chalfont, Inglaterra; ref. 17-0780-01) y con la cantidad de anticuerpo correspondiente, indicada en la tabla 4, durante 2 horas a 4 °C en agitación en un balancín Speci-Mix M26120-26 (Barnstead Thermolyne, Dubuque, Estados Unidos). Pasado este tiempo, los complejos inmunes se precipitaron mediante centrifugación a 10.000 x g a temperatura ambiente durante 20 segundos en una centrífuga Eppendorf 5417 R y se lavaron tres veces con 1 mL de tampón de lisis frío cada una, precipitándolos de la misma forma. Una vez lavados, los complejos inmunoprecipitados se resuspendieron en 30  $\mu\text{L}$  de tampón de carga 2X y fueron sometidos a electroforesis como se describe en el siguiente apartado. Donde se indica, la proteína MMP13 secretada al medio también fue inmunoprecipitada antes de ser analizada por WB. El medio de cultivo (4 mL) de las células tratadas se recogió en un tubo de polipropileno de 15 mL y se centrifugó a 219 x g a 4 °C

durante 3 minutos en una centrífuga Eppendorf 5810 R para sedimentar las células presentes. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 5 mL (Eppendorf; ref. 0030119401) donde se incubó con 60  $\mu$ L de la dilución 1:10 (0,6 mg) de proteína A-Sefarosa™ CL-4B y con 1  $\mu$ g de anti-MMP13 durante 2 horas a 4 °C en agitación en el balancín. Después de la incubación, los complejos inmunes se precipitaron mediante centrifugación a 4.500 x g a temperatura ambiente durante 20 segundos en la misma centrífuga y se procesaron como se ha descrito anteriormente en este apartado para someterlos a electroforesis. Las muestras se guardaron a -20 °C si la electroforesis no se realizó seguidamente.

### 8.3. WB

La separación de las proteínas de las muestras se realizó por electroforesis en condiciones reductoras en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras se hirvieron a 100 °C durante 7 minutos en un termobloque AccuBlock™ D1200 (Labnet International, Woodbridge, Estados Unidos) para asegurar su desnaturalización y se cargaron en un gel de poliacrilamida montado en una cubeta de electroforesis pequeña Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad Laboratories) o en una grande de tipo Sturdier. El porcentaje de poliacrilamida del gel se eligió en función del tamaño de la proteína de interés. Las cubetas se completaron con tampón de electroforesis (0,1 % de SDS; glicina 192 mM; Tris 25 mM) y las proteínas se separaron sometiendo los geles a un voltaje constante de 120 V en el caso de los geles pequeños o de 200 V en los geles grandes. La electroforesis se dio por finalizada cuando el frente de avance, indicado por el azul de bromofenol del tampón de carga, salió del gel. Una vez finalizada, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana Immobilon®-P de PVDF de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro (Merck Millipore; ref. IPVH00010). Para ello, se utilizó el sistema de transferencia húmeda Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories) en tampón de transferencia (glicina 192 mM; Tris 25 mM; pH 8,1-8,5) a un voltaje constante de 20 V durante 14 horas, o a un amperaje constante de 500 mA durante un tiempo fijado en función del porcentaje de poliacrilamida del gel y de sus dimensiones (entre 70 minutos y 3 horas). A continuación, las membranas se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente en tampón salino Tris con Tween® 20 (TBS-T, *Tris buffered saline with Tween® 20*; 0,1 % de Tween® 20; NaCl 150 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) que contenía 1 % de BSA para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana. Pasado este tiempo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-T durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 7 minutos cada una y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados, junto con sus

diluciones, se indican en la tabla 4. Tras realizar nuevamente tres lavados con TBS-T de 7 minutos cada uno, la membrana se incubó en tampón de revelado (0,08 % de luminol; 0,02 % de *p*-iodofenol; Tris-HCl 0,1 M, pH 9,35), al que previamente se le añadió peróxido de hidrógeno 0,44 M, durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, las bandas correspondientes a las proteínas se visualizaron en una película radiográfica Agfa CP-BU NEW (Agfa-Gevaert, Mortsel, Bélgica; ref. EWPJH). Tanto el bloqueo de la membrana como las incubaciones con los anticuerpos o con el tampón de revelado se realizaron en agitación en un balancín Boekel Rocker II (Boekel Scientific, Feasterville-Trevose, Estados Unidos). Los lavados se realizaron en agitación en un agitador orbital Boeco OS 20. El análisis densitométrico de las bandas correspondientes a MMP13 se realizó utilizando el programa de dominio público ImageJ (<https://imagej.nih.gov/nih-image>). Para determinar los valores de la IC<sub>50</sub> se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, Estados Unidos). De manera rutinaria, como control de carga de las muestras en los geles se utilizó la proteína GAPDH.

## 9. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS

El análisis de la interacción entre los receptores ERBB/HER (HER2 y HER3) y la proteína adaptadora SHC se llevó a cabo mediante co-IP seguida de WB. La extracción de proteínas de las células MCF7 tratadas se realizó como se ha descrito en el apartado 8.1, con la diferencia de que las células se lisaron en un tampón de lisis formulado para favorecer el mantenimiento de las interacciones entre proteínas, que contenía el detergente anfótero CHAPS (0,3 % de CHAPS; EDTA 1 mM; NaCl 120 mM; HEPES 40 mM, pH 7,4; aprotinina 1 µg/mL; leupeptina 1 µg/mL; pepstatina 1 µM; PMSF 1 mM; β-glicerofosfato 25 mM; fluoruro sódico 10 mM; ortovanadato sódico 1 mM). La IP subsiguiente se llevó a cabo según se ha descrito en el apartado 8.2 con las siguientes modificaciones. Los complejos inmunes se precipitaron mediante centrifugación a 4 °C y se lavaron con el tampón de lisis con CHAPS frío precipitándolos de la misma forma. Las proteínas unidas a los complejos se analizaron por WB como se describe en el apartado 8.3.

## 10. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE RAS

### 10.1. Expresión de la proteína de fusión GST-RBD

Para expresar la proteína de fusión GST-RBD, que está formada por la proteína glutatión S transferasa (GST) y el dominio de unión a RAS-GTP de RAF (RBD, *RAS-binding domain*), se transformaron bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α con el vector codificante de la proteína de fusión pGEX 2T-RBD (cedido por Eugenio Santos, CIC-IBMCC) siguiendo un protocolo de transformación rápida. La transformación se realizó en esterilidad en la proximidad de la llama de un mechero con alcohol de quemar a partir de 20 µl de bacterias competentes, que se mezclaron con 1 µl de ADN plasmídico en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL de manera manual y suavemente. La mezcla

se incubó en hielo durante 5 minutos, a los que les siguió un choque térmico a 37 °C durante 1 minuto y otra incubación en hielo de 2 minutos. A continuación, se añadieron 200 µL de LB (0,5 % de extracto de levadura; 1 % de NaCl; 1 % de triptona; pH 7,0) a la mezcla y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Las incubaciones tuvieron lugar en un termobloque AccuBlock™ D1100 (Labnet International). Finalmente, se sembraron distintos volúmenes de la mezcla en distintas placas de 100 mm con LB-agar y 100 µg/mL de ampicilina (el plásmido pGEX 2T-RBD contiene el gen de resistencia a ampicilina) con ayuda de un asa de siembra estéril Lazy-L Spreader™ (Sigma-Aldrich; ref. Z376779) y se crecieron a 37 °C durante toda la noche en una estufa Memmert 800 (Memmert, Schwabach, Alemania). Al día siguiente, se picaron algunas colonias con una punta estéril de pipeta de 200 µL (Daslab; ref. 162001) y se inocularon en un tubo de ensayo con 3 mL de LB con 100 µg/mL de ampicilina (una colonia por tubo). Los tubos se incubaron a 37 °C en agitación durante 8 horas y, seguidamente, se inocularon 20 µL del cultivo bacteriano en 1 L de LB con 100 µg/mL de ampicilina en un matraz de 5 L, que se incubó a 37 °C en agitación durante toda la noche. A la mañana siguiente, se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus (Bio-Rad Laboratories) y cuando estaba entre 0,5 y 0,7, se le añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (Invitrogen; ref. AM9464) 500 µM para inducir la producción de la proteína de fusión GST-RBD durante las 4 horas de incubación a 37 °C en agitación subsiguientes. Todas las incubaciones se realizaron a 240 min<sup>-1</sup> en una incubadora con agitación Kühner ISF-1-W (Adolf Kühner, Birsfelden, Suiza). Para recoger las bacterias, el cultivo se distribuyó en tubos de policarbonato de 250 mL, que se centrifugaron a 5.000 x g a temperatura ambiente durante 10 minutos en una centrífuga Beckman Avanti® J-25 (Beckman Coulter Life Sciences). Las bacterias sedimentadas se congelaron a -20 °C si la purificación de la proteína de fusión no se llevó a cabo a continuación.

## 10.2. Purificación de la proteína de fusión GST-RBD

Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 10 mL de tampón de unión (EDTA 10 mM; PMSF 2 mM; en PBS) en un tubo de policarbonato de 50 mL. El homogenado resultante se sonicó seis veces durante 15 segundos cada una a baja amplitud (24 %), con un intervalo de 2 minutos entre pulsos de sonicación, en un sonicador Sonics Vibra-Cell™ VCX-500 (Sonics & Materials, Newtown, Estados Unidos) en hielo. El lisado bacteriano obtenido se clarificó mediante centrifugación a 30.000 x g a 4 °C durante 20 minutos en una centrífuga Beckman Avanti® J-25 y el sobrenadante con la proteína de fusión se distribuyó en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, que se congelaron a -80 °C si no se procedió seguidamente al acoplamiento de la proteína de fusión a bolas de glutatión-Sefarosa™ 4B (GE Healthcare; ref. 17-0756-01) como se describe a continuación.

### 10.3. Acoplamiento de GST-RBD a bolas de glutatión-Sefarosa™ 4B

El acoplamiento de la proteína fusión GST-RBD a las bolas de glutatión-Sefarosa™ 4B se realizó incubando 1 mL de lisado bacteriano con 200 µL de bolas en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL durante 2 horas a 4 °C en agitación en un balancín Speci-Mix M26120-26. Las bolas con la proteína de fusión acoplada se precipitaron por centrifugación a 10.000 x g a 4 °C durante 20 segundos en una centrífuga Eppendorf 5417 R, se lavaron tres veces con 1 mL de PBS frío cada una y se resuspendieron en 1 mL de tampón de lisis con magnesio frío (MLB, *magnesium lysis buffer*; EDTA 1 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; 2 % de glicerol; 1% de Nonidet™ P-40; NaCl 150 mM; HEPES 25 mM, pH 7,5; aprotinina 10 µg/mL; leupeptina 10 µg/mL; PMSF 1 mM; fluoruro sódico 25 mM; ortovanadato sódico 1 mM). La cuantificación de la proteína de fusión acoplada a las bolas se realizó sometiendo una muestra a SDS-PAGE según se describe en el apartado 8.3, tomando como referencia las muestras patrón de BSA que se cargaron en el mismo gel. La visualización de las bandas correspondientes a las proteínas se llevó a cabo tiñendo el gel con BlueSafe (NZYTech, Lisboa, Portugal; ref. MB15201) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez cuantificada, la proteína de fusión acoplada a las bolas se empleó para precipitar la forma activa de RAS (RAS unida a GTP) según se indica a continuación.

### 10.4. Precipitación de RAS-GTP

Para realizar la precipitación de RAS-GTP, las placas de 100 mm con las células MCF7 tratadas se depositaron en hielo y, tras retirar el medio de cultivo, se lavaron dos veces con PBS frío y se incubaron con 1 mL (por placa) de MLB frío. La extracción y la cuantificación de las proteínas se realizaron según se ha indicado en el apartado 8.1. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se incubaron 4 mg de extracto proteico con 100 µL de las bolas acopladas a GST-RBD (20-25 µg) durante 30 minutos a 4 °C en agitación en un balancín Speci-Mix M26120-26. Los complejos se precipitaron por centrifugación a 10.000 x g a temperatura ambiente durante 20 segundos en una centrífuga Eppendorf 5417 R, se lavaron tres veces con 1 mL de MLB frío cada una y se resuspendieron en el mismo volumen de tampón de carga 2X. La proteína RAS-GTP fue analizada por WB como se describe en el apartado 8.3.

## 11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

### 11.1. Extracción y cuantificación de ARN total

La extracción de ARN de las células MCF7 se realizó con el reactivo TRIzol® (Invitrogen; ref. 15596-026). Para ello, las placas de 100 mm con las células tratadas se depositaron en hielo y, después de retirar el medio de cultivo, se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron con 1 mL (por placa) de

TRIzol®. Las células se recogieron con ayuda de un raspador celular y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, donde se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. A continuación, se añadieron 200 µL de cloroformo (Merck; ref. 102445) a cada tubo, se agitaron manualmente durante 15 segundos de forma vigorosa y se volvieron a incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 12.000 x g a 4 °C durante 15 minutos para separar la muestra en tres fases: una fase acuosa superior (incolora) en la que permanece el ARN, una interfase (blanca) en la que permanece el ADN y una fase orgánica inferior (roja) en la que se mantienen las proteínas. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, al que se añadieron 500 µL de isopropanol (Honeywell, Morris Plains, Estados Unidos; ref. 563935) para precipitar el ARN mediante una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente seguida de una centrifugación a 12.000 x g a 4 °C durante otros 10 minutos. El ARN precipitado se lavó con 1 mL de etanol (Merck; ref. 100983) al 75 %, se centrifugó de nuevo a 7.500 x g a 4 °C durante 5 minutos y se dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente, antes de resuspenderlo manualmente en 20 µL de agua libre de ARNasas. Todas las centrifugaciones tuvieron lugar en una centrífuga Eppendorf 5417 R. La concentración de ARN se determinó en un NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific). Para comprobar la integridad del ARN extraído, se prepararon muestras mezclando 1 µg de ARN con tampón de carga 10X (0,41 % de azul de bromofenol; 0,41 % de xileno cianol; 50 % de glicerol), que se sometieron a electroforesis horizontal en un gel de 0,8 % de agarosa (Laboratorios Conda, Madrid, España; ref. 8010) con 2 µg/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich; ref. E1510). La electroforesis se realizó en una cubeta Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories) en tampón TAE (EDTA 1 mM; ácido acético 20 mM; Tris-HCl 40 mM, pH 8,0) a un voltaje constante de 80 V hasta que el frente de avance había recorrido como mínimo 5 cm. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador Bio-Rad Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories) con luz ultravioleta. Una vez confirmada la integridad del ARN, se procedió a la síntesis del ADN complementario al ARN mensajero por retrotranscripción. Cuando la retrotranscripción no se realizó a continuación, las muestras de ARN se guardaron a -80 °C.

## 11.2. Síntesis del ADN complementario

La síntesis del ADN complementario se realizó empleando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Molony (transcriptasa inversa M-MLV, *Molony murine leukemia virus*; Invitrogen; ref. 28025013). La reacción partió de 2 µg de ARN total, a los que se anilló 0,5 µg de un oligonucleótido de politimidinas (oligo-dT<sub>12-18</sub>; Invitrogen) y se añadió 1 µL de una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato 10 mM (Biotools, Madrid, España; ref. 20.031-4179) en un tubo de microcentrífuga de 0,2 mL (Thermo Fisher Scientific; ref. AB-0337). La mezcla se llevó a un volumen final de 12 µL con H<sub>2</sub>O Milli-Q® estéril y se incubó a 65 °C durante 5 minutos. A continuación, los tubos se enfriaron rápidamente en hielo para añadir a cada uno 4 µL del tampón de reacción 5X

(proporcionado con la transcriptasa inversa), 2  $\mu$ L de ditioneitol 0,1 M (proporcionado con la enzima también) y 1  $\mu$ L del inhibidor de ribonucleasa RNasin® (Promega, Madison, Estados Unidos; ref. N2111). Después de mezclar todos los componentes, los tubos se incubaron a 37 °C durante 2 minutos y, por último, se añadió 1  $\mu$ L (200 unidades) de la enzima a la mezcla, que se incubó a 37 °C durante 50 minutos para que la reacción tuviera lugar. Seguidamente, las muestras se calentaron a 70 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima y se guardaron a -20 °C. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica Telstar AV-100 (Azbil Telstar Technologies). Las incubaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Waltham, Estados Unidos). Una vez sintetizado el ADN complementario, la cuantificación de la expresión de *MMP13* se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-PCR, *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*). Del mismo modo se realizó la cuantificación de la expresión de *GAPDH* para normalizar la de nuestro gen de interés.

### 11.3. qRT-PCR

Para realizar la qRT-PCR se empleó el reactivo SYBR® Select Master Mix for CFX (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos; ref. 4472942) que contiene los componentes necesarios para la reacción, menos el ADN molde y los oligonucleótidos cebadores. Los oligonucleótidos cebadores (Invitrogen) utilizados se detallan en la tabla 7 y se habían diseñado previamente en el laboratorio con el programa de dominio público Primer3 (<http://primer3.ut.ee>). Para ello, se emplearon las secuencias de ARN mensajero de cada gen sin intrones de la base de datos pública Ensembl (<https://www.ensembl.org>) y se seleccionó que el producto resultante de la reacción no superase los 250 pb. La reacción tuvo lugar en una placa multipocillo iCycler® iQ™ de 96 pocillos (Bio-Rad Laboratories; ref. 2239441) en la que se añadieron 12,5  $\mu$ L de SYBR® Select Master Mix for CFX, 160 nM de cada oligonucleótido cebador y 5  $\mu$ L de una dilución 1:25 del ADN complementario (20 ng) en un volumen final de 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q® por pocillo y por duplicado. Además, para cada gen analizado se incluyó un control negativo, que contenía todos los componentes de la mezcla, menos el ADN molde que se substituyó por 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q®. La reacción se preparó en condiciones de esterilidad, como se ha indicado en el apartado anterior. Una vez preparada, la placa se selló con una película óptica adhesiva Microseal® B (Bio-Rad Laboratories; ref. MSB1001) y la reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler® iQ™5 Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) con un programa formado por las siguientes etapas: (1) una etapa inicial de 5 minutos a 95 °C para desnaturalizar el ADN; (2) una etapa principal de 40 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización de los productos de la reacción de 30 segundos a 95 °C, un paso de anillamiento de los oligonucleótidos cebadores de 30 segundos a 60 °C y un paso de extensión de 30 segundos a 72 °C, y (3)

una última etapa de extensión adicional de 1 minuto a 72 °C. Al finalizar el programa, las muestras se enfriaron hasta los 68 °C y se calentaron progresivamente hasta los 95 °C con medida continua de la fluorescencia para obtener las curvas de disociación de los productos de la reacción que confirmaran la especificidad de la amplificación. La expresión de *MMP13* de cada muestra fue normalizada con la expresión de *GAPDH* y relativizada con la de las células sin estimular con el método de Livak de  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes.

**Tabla 7. Oligonucleótidos cebadores utilizados para la qRT-PCR**

Gen	Cebador	Secuencia	Amplicón (pb)
<i>MMP13</i>	Sentido	5'-TTG AGC TGG ACT CAT TGT CG-3'	126
	Antisentido	5'-CGC GAG ATT TGT AGG ATG GT-3'	
<i>GAPDH</i>	Sentido	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'	87
	Antisentido	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'	

## 12. IDENTIFICACIÓN DE LAS DIANAS DE DASATINIB

### 12.1. Inmovilización de dasatinib

La inmovilización de dasatinib se realizó a partir de 5 mg de fármaco, que se disolvieron en una solución de acoplamiento (50 % de dimetilformamida; 50 % de carbonato sódico 0,1 M), y se incubaron con 0,5 mg de Sefarosa™ 6B activada por epoxy (GE Healthcare; ref. 17048001) en una columna de vidrio Econo-Column® (Bio-Rad Laboratories; ref. 7372512). La incubación tuvo lugar durante 16 horas a temperatura ambiente en agitación en un balancín Boekel Rocker II y, a continuación, la columna se lavó con la solución de acoplamiento para eliminar el fármaco que no se hubiera acoplado a la resina. Los grupos activos remanentes de la resina se bloquearon con Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, durante 4 horas a temperatura ambiente en agitación en el mismo balancín. Después, la resina se lavó con al menos tres ciclos de soluciones alternantes de pH, consistentes en un primer lavado con un tampón de pH bajo (acetato sódico 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 4,0), seguido de un lavado con un tampón de pH alto (Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 8,0). Finalmente, la resina con dasatinib se resuspendió en el mismo volumen de PBS con 0,05 % de azida sódica (Sigma-Aldrich; ref. S2002) y se utilizó como un agente de afinidad para purificar las dianas de dasatinib según se indica a continuación. La resina control se preparó a partir de 0,5 mg de Sefarosa™ 6B activada por epoxy según lo descrito en este apartado, pero sin acoplar el fármaco.



## 12.2. Purificación de las dianas de dasatinib

La purificación de las dianas de dasatinib se llevó a cabo incubando 25 mg de extracto proteico de las células MCF7 con 100  $\mu$ L de resina control o resina con dasatinib en un tubo de polipropileno de 15 mL en agitación durante 3 horas a 4 °C en un balancín Boekel Rocker II. A continuación, los complejos resina-proteínas de unión resultantes se precipitaron mediante centrifugación a 4.500 x g a temperatura ambiente durante 20 segundos en una centrífuga Eppendorf 5810 R y se lavaron tres veces con tampón de lisis frío precipitándolos de la misma forma. Después del último lavado, los complejos se resuspendieron en 50  $\mu$ L de tampón de carga 2X y las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE según se describe en el apartado 8.3 o guardadas a -20 °C.

## 12.3. Tinción del gel de poliacrilamida y escisión de las bandas de interés

Después de someter las muestras a SDS-PAGE, el gel de poliacrilamida se tiñó con plata utilizando el kit Silver Stain Plus (Bio-Rad Laboratories; ref.161-0449) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las bandas de interés, que correspondían con las proteínas que interaccionaban específicamente con la resina con dasatinib, fueron recortadas del gel manualmente con ayuda de un bisturí por el personal del Servicio de Proteómica del CIC-IBMCC. Este mismo equipo se encargó de llevar a cabo los procesos de digestión trípica e identificación de proteínas, que se describen a continuación.

## 12.4 Digestión trípica de las proteínas en el gel de poliacrilamida

Las bandas recortadas del gel se sometieron a digestión trípica siguiendo el método descrito por Shevchenko y colaboradores (Shevchenko *et al.*, 1996) con algunas modificaciones. Las bandas se incubaron con una solución de desteñido (50 % de ferricianuro de potasio 15 mM; 50 % de tiosulfato de sodio 50 mM) para eliminar la plata, se lavaron con H<sub>2</sub>O Milli-Q® y se deshidrataron con acetonitrilo al 100 %. Una vez deshidratadas, se trataron con ditiotretol 10 mM en bicarbonato de amonio 25 mM durante 1 hora a 56 °C y con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 50 mM durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de un lavado con acetonitrilo al 100 % y bicarbonato de amonio 20 mM, se les adicionó tripsina porcina modificada a una concentración final de 6 ng/ $\mu$ L en bicarbonato de amonio 20 mM y se incubaron a 37 °C durante 16 horas. El sobrenadante de cada una de las digestiones se recuperó y se secó en una centrífuga de vacío para resuspenderlo finalmente en un volumen de 5  $\mu$ L de ácido trifluoroacético al 0,1 % y acetonitrilo al 50 %. La identificación de las proteínas de unión a dasatinib se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

## 12.5 Identificación de las proteínas de unión a dasatinib

Para identificar las proteínas de unión a dasatinib, se cargó en una placa AnchorChip™ de 400 µm de diámetro de anillo (Bruker Daltonics, Billerica, Estados Unidos; ref. 8280792) 0,5 µL de la solución de matriz (5 g/L de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en acetonitrilo al 33 % con ácido trifluoroacético al 0,1 %), sobre la que se añadió 1 µL de la solución peptídica descrita en el apartado anterior para cada muestra y por duplicado. Las muestras cargadas se dejaron secar a temperatura ambiente y la adquisición de espectros de masas peptídicas se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics) equipado con el programa FlexControl™ 3.0 (Bruker Daltonics). El rango de adquisición de espectros de masas se fijó entre 700 y 3.500 Da. Los espectros de masas obtenidos se procesaron y analizaron con el programa FlexAnalysis™ 3.0 (Bruker Daltonics). Los picos generados se enviaron al programa BioTools™ 3.2 (Bruker Daltonics) para la identificación de las proteínas utilizando el motor de búsqueda Mascot versión 2.3.02 (Matrix Science, Londres, Inglaterra) (Perkins *et al.*, 1999) contra la base de datos Swiss-Prot (Swiss-Prot 2015\_11; 549.832 secuencias; 196.078138 residuos). Un resultado se consideró significativo ( $p < 0,05$ ) cuando la puntuación reportada superó el valor de 56.

## 12.6 Validación de las proteínas identificadas

Para validar las dianas de dasatinib identificadas, llevamos a cabo experimentos de precipitación con las resinas descritas en el apartado 12.1 seguidos de WB. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se incubaron 2 mg de extracto proteico de las células MCF7 con 60 µL de resina control o con dasatinib durante 3 horas a 4 °C en agitación en un balancín Speci-Mix M26120-26. Los complejos resina-proteínas de unión resultantes se precipitaron mediante centrifugación a 10.000 x g a temperatura ambiente durante 20 segundos en una centrífuga Eppendorf 5417 R. y se lavaron tres veces con 1 mL de tampón de lisis frío cada una, precipitándolos de la misma forma. Los complejos se resuspendieron en 30 µL de tampón de carga 2X y las proteínas unidas a las resinas fueron analizadas por WB como se describe en el apartado 8.3.

## 13. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 13.1. Ensayo de proliferación celular

El análisis de la proliferación celular se realizó mediante ensayos de metabolización del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma-Aldrich; ref. M2128) (Mosmann, 1983). Las células MCF7 se sembraron en placas de 24 pocillos (Corning; ref. 3524) a una densidad de 10.000 células por pocillo. Después de 24 horas, las células se privaron de suero durante 16-18 horas y se trataron con las concentraciones de dasatinib indicadas durante 3 horas o con 0,1 % de DMSO (vehículo

control) por cuadruplicado. A continuación, las células se estimularon o no con NRG 10 nM y la proliferación celular se evaluó después de 3 y 5 días de estimulación. Del mismo modo, las células BT474 y BTRH se sembraron a una densidad de 22.000 células por pocillo. Una vez adheridas, las células se trataron por cuadruplicado con los inhibidores indicados durante 2 días o con 0,1 % de DMSO (vehículo control). En ambos casos, se adicionó MTT al medio de las células a una concentración final de 500 µg/mL y se incubaron durante 1 hora a 37 °C en la incubadora de cultivos celulares. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de las células y se añadieron 500 µL de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de formazán (MTT reducido por las células vivas). Las placas se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente en un agitador orbital Boeco OS 20 durante 10 minutos y la absorbancia de los cristales de formazán se leyó a 570 nm en un espectrofotómetro Ultra Evolution 1536. Los datos se presentan como la absorbancia media  $\pm$  SD o como el porcentaje de metabolización de MTT con respecto al control medio  $\pm$  SD de los cuadruplicados de un experimento representativo que se repitió como mínimo tres veces.

### 13.2. Ensayo de migración celular

La capacidad migratoria de las células se evaluó mediante ensayos de cierre de herida en placa. Para los ensayos con dasatinib, las células MCF7 y BT474 se sembraron en placas de 6 pocillos (Corning; ref. 3516) a una densidad de  $3 \times 10^6$  células por pocillo para que 24 horas después alcanzaran la confluencia. Una vez alcanzada, las células se privaron de suero durante 16-18 horas y la monocapa de células se raspó a lo largo del pocillo con una punta estéril de pipeta de 10 µL (Deltalab; Rubí, España; ref. 200024) por triplicado para crear heridas paralelas entre sí. Los pocillos se lavaron con PBS dos veces para remover las células que se habían despegado y se completaron con medio sin suero suplementado con dasatinib 1 µM o con 0,1 % de DMSO (vehículo control). Además, el medio se suplementó con mitomicina C 1 µM (Sigma-Aldrich; ref. M4287) para inhibir la proliferación celular y que no interfiriera con el proceso de migración. Tras 3 horas de tratamiento, las células se estimularon o no con NRG 10 nM (tiempo inicial) y la migración se monitorizó como se describe más adelante. Para analizar el efecto del silenciamiento de *SRC* o de *YES1* sobre la migración inducida por NRG, las células MCF7, que habían sido infectadas con los vectores lentivirales como se describe en el apartado 7, se sembraron y se procesaron del mismo modo. Después de lavar los pocillos con PBS, las células se estimularon o no con NRG 10 nM (tiempo inicial) y se trataron con mitomicina C. Para los ensayos con bortezomib, las células BT474 y BTRH se sembraron y se procesaron igualmente con la excepción de que no se privaron de suero. Una vez lavados los pocillos con PBS, las células se trataron con bortezomib 50 nM (tiempo inicial) o con 0,1 % de DMSO (vehículo control), junto con mitomicina C. En todos los casos, la migración de las células se monitorizó mediante la captura de imágenes de un punto determinado de cada una de las heridas realizadas. Las imágenes se capturaron cada media hora

hasta que la herida en las células estimuladas con NRG se cerró (MCF7) o durante un máximo de 48 horas (BT474 y BTRH) en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-E (Nikon, Tokio, Japón) con un objetivo 10X y equipado con el programa MetaMorph® Microscopy Automation and Image Analysis Software (Molecular Devices, Sunnyvale, Estados Unidos). El área entre los bordes de la herida se midió con el programa de dominio público ImageJ y se cuantificó el porcentaje de cierre de herida con respecto al tiempo inicial. Los datos se presentan como el porcentaje de cierre de herida medio  $\pm$  SD de los triplicados de un experimento representativo que se repitió como mínimo tres veces. Además, se muestran imágenes representativas del mismo experimento.

### **13.3. Ensayo de invasión celular**

El análisis de la invasión celular se llevó a cabo mediante ensayos de invasión en insertos de tipo *transwell* con una membrana de 8  $\mu$ m de tamaño de poro y para placas de 24 pocillos (Corning; ref. 353097). Como preparación de membrana basal utilizamos Matrigel® Basement Membrane Matrix (Corning; ref. 354230), que se descongeló lentamente en hielo a 4 °C y se manipuló en frío para evitar su solidificación. Los insertos se colocaron en esterilidad en una placa de 24 pocillos y el Matrigel® descongelado se diluyó en H<sub>2</sub>O Milli-Q® fría a una concentración final de 125  $\mu$ g/mL, para añadir 100  $\mu$ L de la dilución a cada inserto. La placa se incubó en la cabina de seguridad biológica toda la noche y con la tapa ligeramente abierta para permitir que el agua se evaporara totalmente. Al día siguiente, las células MCF7 y BT474 se sembraron por triplicado a una densidad de 50.000 células por inserto y, una vez adheridas, se privaron de suero durante 16-18 horas. Después, las células se trataron con dasatinib 1  $\mu$ M durante 3 horas o con 0,1 % de DMSO (vehículo control) y se estimularon o no con NRG 10 nM. El compartimento inferior se completó con 600  $\mu$ L de medio sin suero y la invasión se determinó según se describe más adelante. Por otro lado, las células MCF7, que habían sido infectadas con los vectores lentivirales, se procesaron de la misma forma con la excepción de que no recibieron tratamiento previo a la estimulación con NRG. Por último, las células BT474 y BTRH se sembraron a la misma densidad celular en medio suplementado con 2 % de FBS y, una vez adheridas, se trataron con bortezomib 50 nM o con 0,1 % de DMSO (vehículo control). El compartimento inferior se completó con 600  $\mu$ L de medio suplementado con 10 % de FBS para generar un gradiente de suero que estimulara la invasión. En todos los casos, la invasión se determinó después de 48-72 horas de estimulación con NRG o de tratamiento con bortezomib. Para ello, se retiró de los insertos con un palillo de algodón el Matrigel® con las células que no habían invadido y se incubaron en paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente para fijar las células que habían invadido. A continuación, los insertos se lavaron con PBS tres veces y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los insertos se lavaron con H<sub>2</sub>O Milli-Q® tres veces para eliminar el cristal violeta remanente y se dejaron secar. El número de células que habían

invadido a través del Matrigel® se contó en cada inserto con un microscopio invertido Zeiss Axiovert 25 y los datos se presentan como el número de células medio  $\pm$  SD de los triplicados de un experimento representativo que se repitió como mínimo tres veces.

### 13.4. Ensayo de adhesión al sustrato

Los ensayos de adhesión al sustrato se realizaron sobre la proteína de matriz extracelular fibronectina (Sigma-Aldrich; ref. F0635). Para ello, las células BT474 y BTRH se sembraron y se trataron con bortezomib durante 12 horas o con DMSO como se indica en el apartado 5. En el momento del tratamiento, se añadieron 100  $\mu$ L de fibronectina (5  $\mu$ g) por pocillo y por cuadruplicado en una placa de 96 pocillos, que se incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se aspiró el exceso de fibronectina y cada pocillo se incubó con 200  $\mu$ L de 10 mg/mL de BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear la adhesión inespecífica. Después de lavar los pocillos tres veces con 200  $\mu$ L de PBS cada una, las células tratadas se sembraron por cuadruplicado a una densidad de 25.000 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ L y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C en la incubadora de cultivos celulares para permitir su adhesión. Transcurrido este tiempo, las células que no se habían adherido se eliminaron invirtiendo la placa con un golpe seco, mientras que las células adheridas se fijaron añadiendo 100  $\mu$ L de paraformaldehído al 4 % a cada pocillo e incubándolas durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron tres veces con 100  $\mu$ L de PBS cada una y se añadieron 100  $\mu$ L de una solución de cristal violeta al 0,1 % por pocillo para teñir las células adheridas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, los pocillos se lavaron tres veces con 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q® cada una y el cristal violeta se solubilizó añadiendo a cada pocillo 100  $\mu$ L de ácido acético al 10 % e incubando la placa en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital Boeco OS 20. La absorbancia se leyó a 570 nm en un espectrofotómetro Ultra Evolution 1536. Los datos se presentan como el porcentaje de adhesión con respecto al control medio  $\pm$  SD de los cuadruplicados de un experimento representativo que se repitió como mínimo tres veces.

## 14. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA *IN VITRO*

### 14.1. Ensayo de actividad caspasa

Para medir la actividad de las caspasas 3 y 8, utilizamos los sustratos peptídicos fluorogénicos Ac-DEVD-AFC (BD Biosciences; ref. 556574) y Ac-IETD-AFC (BD Biosciences; ref. 556562), respectivamente. Las células BT474 y BTRH se sembraron y se trataron con bortezomib o con DMSO según se indica en el apartado 5. La extracción de proteínas y la cuantificación se realizaron como se describe en el apartado 8.1. Para cada una de las actividades caspasa, se añadieron 50  $\mu$ g de extracto proteico por pocillo y por triplicado en una placa de 96 pocillos blanca (Corning; ref. 07-200-589). Los pocillos se llevaron hasta un volumen final de 200  $\mu$ L con tampón de reacción (EDTA 1 mM; NaCl

150 mM; 10 % de sacarosa; 0,1 % de CHAPS; HEPES 25 mM, pH 7,4) suplementado con ditiotreititol 20 mM y con el sustrato correspondiente a una concentración de 10  $\mu$ M. Además, para cada actividad caspasa se incluyó un control negativo de actividad sin extracto proteico, que contenía 200  $\mu$ L de tampón de reacción suplementado. El contenido de cada pocillo se mezcló pipeteando varias veces y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora en el lector de placa Synergy™ 4 (BioTek Instruments, Winooski, Estados Unidos) equipado con el programa Gene5 Data Analysis Software (BioTek Instruments). Pasado este tiempo, la fluorescencia liberada se leyó a una longitud de onda de excitación de 400 nm y de emisión de 505 nm. La actividad caspasa de cada muestra se determinó restándole a la señal media obtenida la señal inespecífica detectada en el control negativo. Los datos se presentan como la actividad media  $\pm$  SD de los triplicados de un experimento representativo que se repitió tres veces.

## 14.2. Ensayo de actividad quimotróptica del proteasoma

El ensayo fluorimétrico para medir la actividad quimotróptica del proteasoma se realizó con el sustrato peptídico fluorogénico suc-LLVY-AMC (R&D Systems, Mineápolis, Estados Unidos; ref. S-280) siguiendo el método de Lima y Rattan (Lima y Rattan, 2010). Las células BT474 y BTRH se sembraron y se trataron con bortezomib o con DMSO como se indica en el apartado 5. Después del tratamiento, las placas de 100 mm con las células tratadas se depositaron en hielo y, tras retirar el medio, las células adheridas se lavaron dos veces con PBS frío y se incubaron con 1 mL (por placa) de tampón de lisis frío (0,2 % de Triton™ X-100; EDTA 1 mM; NaCl 50 mM; sacarosa 250 mM; HEPES 10 mM, pH 8,0) durante 5 minutos en hielo. El homogenado celular se recogió con ayuda de un raspador celular, se pasó a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se sonicó dos veces durante 6 segundos cada una a baja amplitud (24 %), con un intervalo de 2 minutos entre pulsos de sonicación, en un sonicador Sonics Vibra-Cell™ VCX-500 en hielo. El lisado celular obtenido se clarificó mediante centrifugación a 10.000  $\times g$  a 4 °C durante 10 minutos en una centrífuga Eppendorf 5417 R y el sobrenadante se recogió en otro tubo. La concentración de proteína fue determinada mediante el método del BCA según se indica el apartado 8.1 y, una vez cuantificada, se añadieron 25  $\mu$ g de extracto proteico por pocillo y por cuadruplicado en una placa de 96 pocillos blanca. Tres de los pocillos se llevaron hasta un volumen final de 200  $\mu$ L con tampón de reacción (EDTA 1 mM; NaCl 50 mM; sacarosa 250 mM; HEPES 25 mM, pH 8,0) al que se le había añadido un 2 % de DMSO (vehículo control). Para cada muestra se realizó un control negativo de actividad, por lo que el cuarto pocillo se llevó hasta un volumen final de 200  $\mu$ L con tampón de reacción al que se le había añadido el inhibidor del proteasoma MG132 a una concentración final de 400  $\mu$ M. La placa se incubó a 37 °C durante 10 minutos en el lector de placa Synergy™ 4 equipado con el programa Gene5 Data Analysis Software y, seguidamente, se añadieron 25  $\mu$ L del sustrato suc-LLVY-AMC 200  $\mu$ M a cada pocillo. Después de agitar la placa a 37 °C durante 10 segundos, la fluorescencia se leyó a la misma temperatura durante 20 minutos en intervalos de

1 minuto a una longitud de onda de excitación de 380 nm y de emisión de 460 nm en el mismo equipo. La actividad del proteasoma se determinó tomando la pendiente de la cinética lineal de la reacción. Para ello, la pendiente de la réplica obtenida en presencia de MG132 se restó a la pendiente media de las otras tres réplicas para eliminar la actividad inespecífica del proteasoma. Los datos se expresan como el porcentaje de actividad de cada muestra con respecto a la muestra control de un experimento representativo que se repitió como mínimo tres veces.

## 15. ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

### 15.1 Ensayo de ciclo celular

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo, marcando las células con yoduro de propidio (PI, *propidium iodide*). Las células BT474 y BTRH se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 100.000 células por pocillo y, 24 horas después, se trataron con bortezomib 50 nM durante 24 horas o con 0,1 % de DMSO (vehículo control). Seguidamente, se recogió el medio de cultivo con las células no adheridas en un tubo de poliestireno de fondo redondo de 5 mL (Corning; ref. 352008). Las células adheridas se lavaron con 1 mL de PBS por pocillo, que se recogió en el tubo, y se incubaron con 200  $\mu$ L de la solución de 0,25 % de tripsina-EDTA 1 mM durante 2 minutos a 37 °C. El efecto de la tripsina se neutralizó añadiendo 1 mL de medio, que también se recogió en el tubo. Los tubos se centrifugaron a 300 x g a 10 °C durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5810 R. Las células sedimentadas se lavaron con PBS del mismo modo y, una vez lavadas, se fijaron y permeabilizaron resuspendiéndolas en 1 mL de etanol al 70 % frío e incubándolas durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente, los tubos se centrifugaron en las mismas condiciones y las células sedimentadas se resuspendieron en 500  $\mu$ L de PBS con 500  $\mu$ g/mL de ARNasa libre de ADNasa (Sigma-Aldrich; ref. 1111991501), incubándolas durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado este tiempo, se añadieron 5  $\mu$ g/mL de PI (Sigma-Aldrich; ref. P4864) en cada tubo y las células se analizaron en un citómetro BD Accuri™ C6 Cytometer (BD Biosciences) equipado con el programa C6 Analysis Software (BD Biosciences) adquiriéndose 50.000 eventos por muestra a baja velocidad. El contenido de ADN de las células se analizó con el mismo programa excluyendo los agregados celulares y se calcularon los porcentajes de células en las fases SubG<sub>0</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M. Los resultados son representativos de experimentos que se repitieron al menos tres veces.

### 15.2. Ensayo de apoptosis

El análisis de la apoptosis o muerte celular programada se llevó a cabo mediante citometría de flujo marcando las células con PI y con anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*). Las células BT474 y BTRH se sembraron como se ha indicado en el apartado anterior y, tras 24 horas, se trataron con bortezomib 50 nM durante 24 o 48 horas o con 0,1 %

de DMSO (vehículo control). Después, se recogieron tanto las células no adheridas presentes en el medio de cultivo como las adheridas al pocillo y se lavaron con PBS según se ha descrito en el apartado anterior. Las células sedimentadas se resuspendieron en 100  $\mu$ L de tampón de unión frío ( $\text{CaCl}_2$  2,5 mM; NaCl 140 mM; HEPES 10 mM, pH 7,4), al que se le habían añadido 5  $\mu$ L de anexina V-FITC (BD Biosciences; ref. 556420) y 5  $\mu$ L de la solución de 50  $\mu$ g/mL de PI. Como controles para la compensación de los canales de fluorescencia del citómetro, algunas células se tiñeron solo con anexina V-FITC, otras solo con PI y otras se quedaron sin teñir. Las muestras se mezclaron suavemente con un vórtex Boeco V1 Plus (Boeckel) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad. Pasado este tiempo, se añadieron 400  $\mu$ L de tampón de unión en cada tubo y se volvieron a mezclar suavemente con el vórtex. Las células se analizaron en un citómetro BD Accuri™ C6 Cytometer equipado con el programa C6 Analysis Software adquiriéndose 50.000 eventos por muestra a velocidad media. El análisis de datos se llevó a cabo usando el mismo programa y se calcularon los porcentajes de células apoptóticas y viables. Los resultados son representativos de un experimento que se repitió como mínimo tres veces.

## 16. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ESTUDIOS *IN VIVO*

### 16.1. Animales de experimentación

Para los estudios *in vivo*, se utilizaron hembras de ratón BALB/c *nu/nu* de al menos siete semanas de edad y de peso en torno a 20 g, que fueron obtenidas de Charles River Laboratories (Wilmington, Estados Unidos). El mantenimiento y la manipulación de los animales se llevó a cabo en una zona libre de patógenos del animalario de la Universidad de Salamanca (Salamanca, España) siguiendo las guías institucionales de acuerdo con la legislación europea (Directiva Europea 2010/63/UE) y española (Real Decreto 53/2013).

### 16.2. Generación de xenoinjertos

Un total de  $5 \times 10^6$  células MCF7-NRG $\alpha$ 2c-Luc se resuspendieron en 50  $\mu$ L de medio de cultivo junto con 50  $\mu$ L de Matrigel® y se inyectaron de manera subcutánea en la línea mamaria de cada ratón ( $n = 10$ ). En cada uno de ellos se realizaron dos inyecciones (una en cada flanco) para aumentar el tamaño muestral ( $n = 20$ ). El diámetro de los tumores se midió cada cuatro días con un pie de rey y el volumen tumoral se calculó con la siguiente fórmula:  $\text{volumen} = (\text{ancho}^2 \times \text{longitud})/2$ . Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 100  $\text{mm}^3$  (30 días después de la inyección), los ratones se dividieron en dos grupos con volúmenes tumorales medios similares para comenzar el tratamiento ( $n = 5$  en cada grupo experimental). Los ratones de uno de los grupos recibieron diariamente 10 mg/kg de dasatinib de manera oral, mientras que los del otro grupo recibieron ácido tartárico 25 mM (vehículo control) oralmente cada día. Una vez iniciado el tratamiento, el tamaño de los tumores se midió semanalmente de



manera indirecta mediante la detección de la emisión del flujo de fotones con un sistema de imagen óptica *in vivo* IVIS 50 Imaging System (Xenogen, Alameda, Estados Unidos) equipado con el programa Living Image Software (Xenogen). Para poder detectar la emisión del flujo de fotones de las masas tumorales, se inyectaron 100 mg/kg de sal de potasio de la D-luciferina (Regis Technologies, Morton Grove, Estados Unidos; ref. 1-360222-200) en la cavidad peritoneal de cada ratón 15 minutos antes de adquirir las imágenes y se anestesiaron con isoflurano (Vetflurane®; Virbac, Carros, Francia). La diseminación local de los tumores también se analizó midiendo la anchura de la señal de luminiscencia 90 días después de la inyección de las células y coincidiendo con el final del experimento. Todos los datos se presentan como la media  $\pm$  SD de los tumores primarios analizados en cada condición experimental.

### 16.3. Preparación de las muestras tumorales

Después de sacrificar a los animales mediante sobreexposición a isoflurano, cada tumor extraído se guardó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Una vez congelados, los tumores se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Para preparar las muestras, los tumores fueron troceados con ayuda de un bisturí, lavados con PBS frío y homogeneizados en un homogeneizador Dispomix (L&M Biotech, Holly Springs, Estados Unidos) en el tampón de lisis frío (1,5 mL por cada 100 mg de tejido) empleado para los lisados celulares, pero suplementado con una concentración de inhibidores de proteasas 10 veces superior. El homogenado resultante se centrifugó a  $10.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos en una centrífuga Eppendorf 5417 R. El sobrenadante se recogió en otro tubo y la concentración de proteína fue determinada mediante el método del BCA para preparar las muestras según se describe en el apartado 8.1. El análisis de las proteínas de interés se llevó a cabo mediante WB como se indica en el apartado 8.3.

## 17. ANÁLISIS FUNCIONAL DE ENRIQUECIMIENTO GÉNICO

El análisis funcional de enriquecimiento génico se llevó a cabo con los datos de expresión génica procedentes del análisis comparativo entre las células BT474 y BTRH realizado previamente en el laboratorio (disponibles en el repositorio de datos genómicos GEO con la referencia GSE119397) a través de chips de ADN complementario (*microarrays*). En primer lugar, los datos crudos (en formato CEL) se normalizaron utilizando el algoritmo RMA implementado en el programa Expression Console Software versión 1.4.1 (Affymetrix). Los datos normalizados (en formato TXT) se analizaron con el programa GSEA (Subramanian *et al.*, 2005) para identificar conjuntos de genes relacionados funcionalmente que presentaban diferencias de expresión estadísticamente significativas entre ambas líneas celulares. Para ello, se seleccionaron un total de 190 conjuntos de genes pertenecientes a distintas categorías funcionales procedentes de las anotaciones de la base de datos para GSEA Molecular

Signatures (MSigDB) y el número de permutaciones realizadas fue de 1.000. El análisis reporta una puntuación normalizada de enriquecimiento (NES, *normalized enrichment score*) para cada conjunto de genes seleccionado, que es positiva si el conjunto está enriquecido o sobrerrepresentado por genes sobreexpresados en las células BT474 y negativa si está enriquecido o sobrerrepresentado por genes sobreexpresados en las células BTRH. Un conjunto de genes se consideró significativamente enriquecido cuando el  $p$  valor fue menor que 0,05. El mapa de interacciones entre los conjuntos de genes analizados se construyó utilizando Enrichment Map de Cytoscape (Merico *et al.*, 2010).

## **18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

El análisis estadístico de los datos experimentales obtenidos en este trabajo se llevó a cabo con el programa de análisis de datos IBM SPSS Statistics versión 24.0 (IBM, Armonk, Estados Unidos). La comparación de variables continuas entre dos grupos se realizó utilizando el test  $t$  de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el  $p$  valor fue menor que 0,05.

## **IV. RESULTADOS**

---



# **CAPÍTULO 1**

---

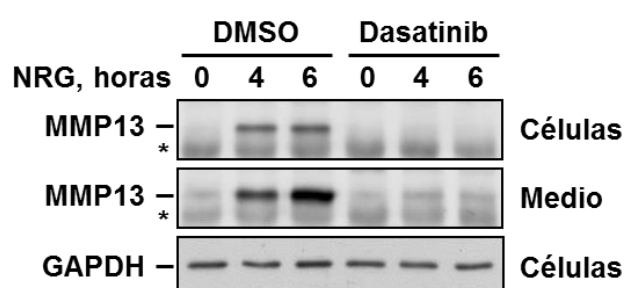
**Análisis del efecto de dasatinib sobre la diseminación metastásica promovida por NRG y mediada por MMP13 en cáncer de mama**



# 1. REGULACIÓN DEL EFECTO DE DASATINIB SOBRE LA PRODUCCIÓN DE MMP13

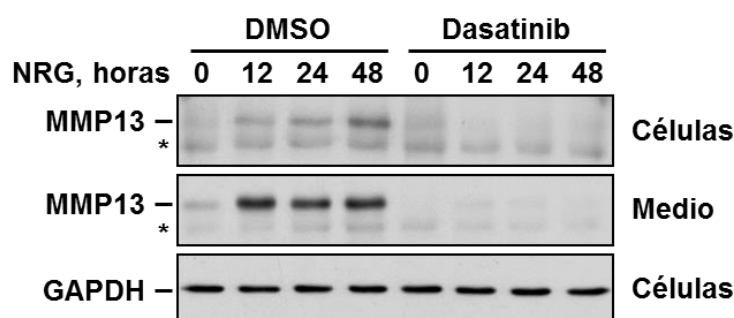
## 1.1. Efecto de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG en las células MCF7

Para analizar el efecto de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG en cáncer de mama, elegimos como modelo de estudio la línea celular MCF7. Esta línea celular se caracteriza por presentar niveles normales tanto del receptor HER2 como de los otros receptores de la misma familia, y por responder de manera mitogénica a la adición de NRG soluble exógena (Holmes *et al.*, 1992). Las células se trataron con dasatinib a una concentración de 1  $\mu$ M durante 3 horas o con 0,1 % de DMSO (vehículo control) y, a continuación, se estimularon o no (células control) con NRG 10 nM durante 4 y 6 horas. Estos tiempos de estimulación con NRG fueron elegidos de acuerdo con resultados previos del laboratorio para poder observar bien tanto la inducción de la producción de MMP13 en las células MCF7 como su acumulación en el medio de cultivo (Seoane *et al.*, 2016). Después de la estimulación con NRG, las células se lisaron y los medios de cultivo se recogieron para analizar los niveles de MMP13 mediante IP seguida de WB. Como esperábamos, la estimulación con NRG de las células MCF7 que habían sido tratadas previamente con DMSO produjo un aumento en los niveles de MMP13 tanto a las 4 como a las 6 horas de estimulación, que fue acompañado por la acumulación de la proteína en el medio de cultivo (Figura 10). Sin embargo, el tratamiento previo de las células MCF7 con dasatinib impidió el aumento en los niveles de MMP13 a estos tiempos de estimulación con NRG, así como la acumulación de la proteína en el medio de cultivo (Figura 10).



**Figura 10. Análisis del efecto de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG en las células MCF7.** Las células se privaron de suero durante 16-18 horas y, seguidamente, se trataron con dasatinib 1  $\mu$ M durante 3 horas o con 0,1 % de DMSO. A continuación, las células se estimularon o no (tiempo 0 horas) con NRG 10 nM durante 4 o 6 horas. Después de la estimulación y de lisar las células, MMP13 se inmunoprecipitó de los extractos proteicos celulares (células) o del medio de cultivo (medio) y se analizó por WB. Los asteriscos indican la cadena pesada de la inmunoglobulina empleada para la IP de MMP13. Los niveles de GAPDH se evaluaron como control de carga de las muestras.

Una vez observado el efecto inhibitorio de dasatinib sobre la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG, quisimos explorar si este efecto era transitorio o prolongado en el tiempo, puesto que en el laboratorio se había observado previamente que la inducción de la producción de MMP13 en las células MCF7 tras la estimulación con NRG se mantenía por lo menos 48 horas después de la estimulación (Seoane *et al.*, 2016). Para alcanzar este objetivo, las células MCF7 se procesaron como se ha descrito anteriormente, pero la estimulación con NRG 10 nM se realizó durante 12, 24 y 48 horas. El aumento en los niveles de MMP13 inducido tras la estimulación con NRG en las células MCF7 que habían sido tratadas previamente con DMSO se observó a todos los tiempos de estimulación, del mismo modo que la acumulación de la proteína en el medio de cultivo (Figura 11). Cuando las células MCF7 se trataron previamente con dasatinib, el tratamiento impidió el aumento en los niveles de MMP13 tras la estimulación con NRG durante las 48 horas que duró la estimulación, al igual que la acumulación de la proteína en el medio de cultivo (Figura 11).



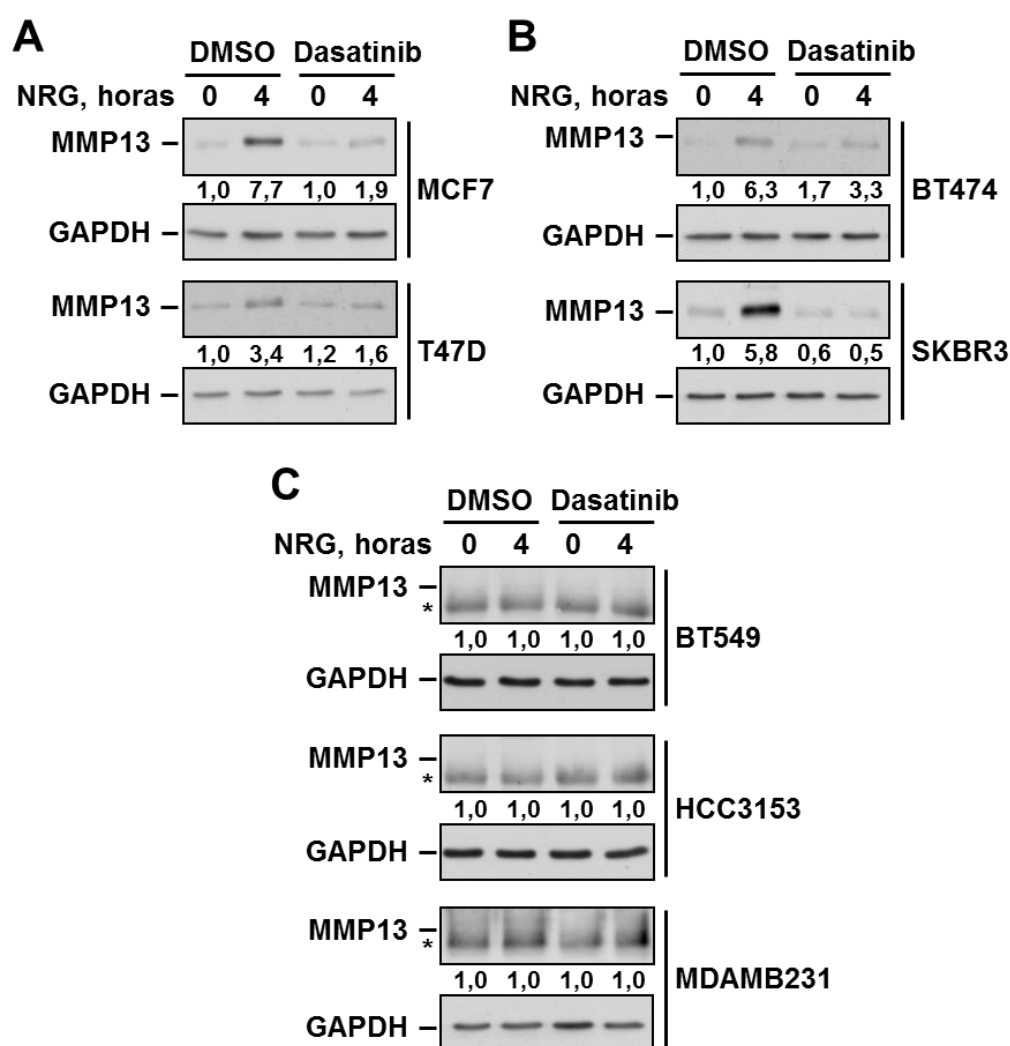
**Figura 11. Efecto de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras tiempos largos de estimulación con NRG en las células MCF7.** Las células se trataron con dasatinib o con DMSO como se indica en la figura anterior. Seguidamente, las células se estimularon o no (tiempo 0 horas) con NRG 10 nM durante 12, 24 o 48 horas y se lisaron. MMP13 fue inmunoprecipitada de los extractos proteicos celulares (células) o del medio de cultivo (medio) y analizada mediante WB.

## 1.2. Efecto de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG en distintas líneas celulares

A continuación, nos propusimos explorar si el efecto inhibitorio de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG observado en la línea celular MCF7 era propio de estas células o común a otras líneas celulares. Para ello, analizamos el efecto del tratamiento con dasatinib en otras líneas celulares, que, a su vez, pertenecían a distintos subtipos histológicos de cáncer de mama. Como modelos de cáncer de mama positivo para receptores hormonales, además de la línea celular MCF7, elegimos la línea celular T47D. Del mismo modo que lo observado en las células MCF7, la estimulación con NRG de las células T47D que habían sido tratadas previamente con DMSO produjo un aumento en los niveles de MMP13, que fue bloqueado cuando las células se trataron previamente con dasatinib (Figura 12A). Para continuar explorando si el



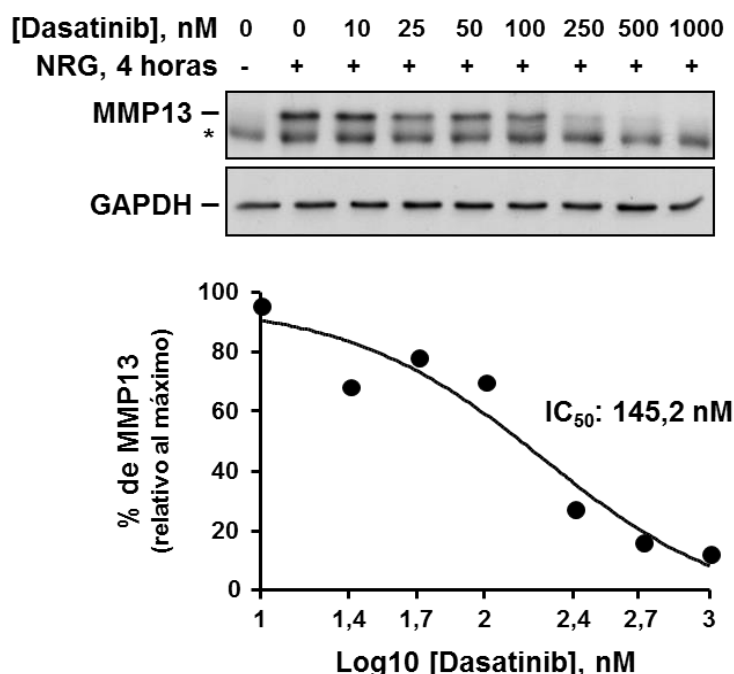
efecto inhibitorio de dasatinib tenía lugar en líneas celulares pertenecientes a otros subtipos histológicos de cáncer de mama, elegimos las líneas celulares BT474 y SKBR3 como modelos de tumores HER2 positivo. El aumento en los niveles de MMP13 también se observó cuando las células BT474 y SKBR3 se estimularon con NRG (Figura 12B). El tratamiento previo de las células con dasatinib impidió la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG (Figura 12B), confirmando que el efecto inhibitorio de dasatinib en este proceso era común a distintos subtipos histológicos de cáncer de mama. Como modelos de cáncer de mama triple negativo, elegimos las líneas celulares BT549, HCC3153 y MDAMB231. La estimulación de estas células con NRG no indujo la producción de MMP13 y, por consiguiente, el tratamiento previo con dasatinib condujo al mismo resultado (Figura 12C).



**Figura 12. Análisis del efecto de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG en líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a distintos subtipos histológicos.** Las células (A) MCF7, T47D, (B) BT474, SKBR3, (C) BT549, HCC3153 y MDAMB231, que previamente se habían privado de suero durante 16-18 horas, se trataron con dasatinib 1  $\mu$ M durante 3 horas o con 0,1 % de DMSO y, a continuación, se estimularon o no (tiempo 0 horas) con NRG 10 nM durante 4 horas. Después de lisar las células, se inmunoprecipitó MMP13 y se analizó por WB. Los números que aparecen debajo de las películas escaneadas son una medida cuantitativa de la tasa de cambio de MMP13 con respecto a los niveles de las células en condiciones basales.

### 1.3. Efecto de la dosis de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si el efecto inhibitorio de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG era dependiente de la dosis. Para alcanzar este objetivo, las células MCF7 se trataron con distintas concentraciones de dasatinib (10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 nM) durante 3 horas y, a continuación, se estimularon con NRG 10 nM durante 4 horas. El tratamiento con dasatinib inhibió la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG de manera dependiente de la dosis, alcanzando la inhibición completa a la dosis de 1  $\mu$ M (Figura 13). A partir de la cuantificación densitométrica de las bandas de MMP13 calculamos la  $IC_{50}$  para la inhibición de MMP13, que fue de 145,2 nM (Figura 13). Teniendo en cuenta estos datos, decidimos continuar realizando el tratamiento de las células con las dosis de dasatinib de 1  $\mu$ M.

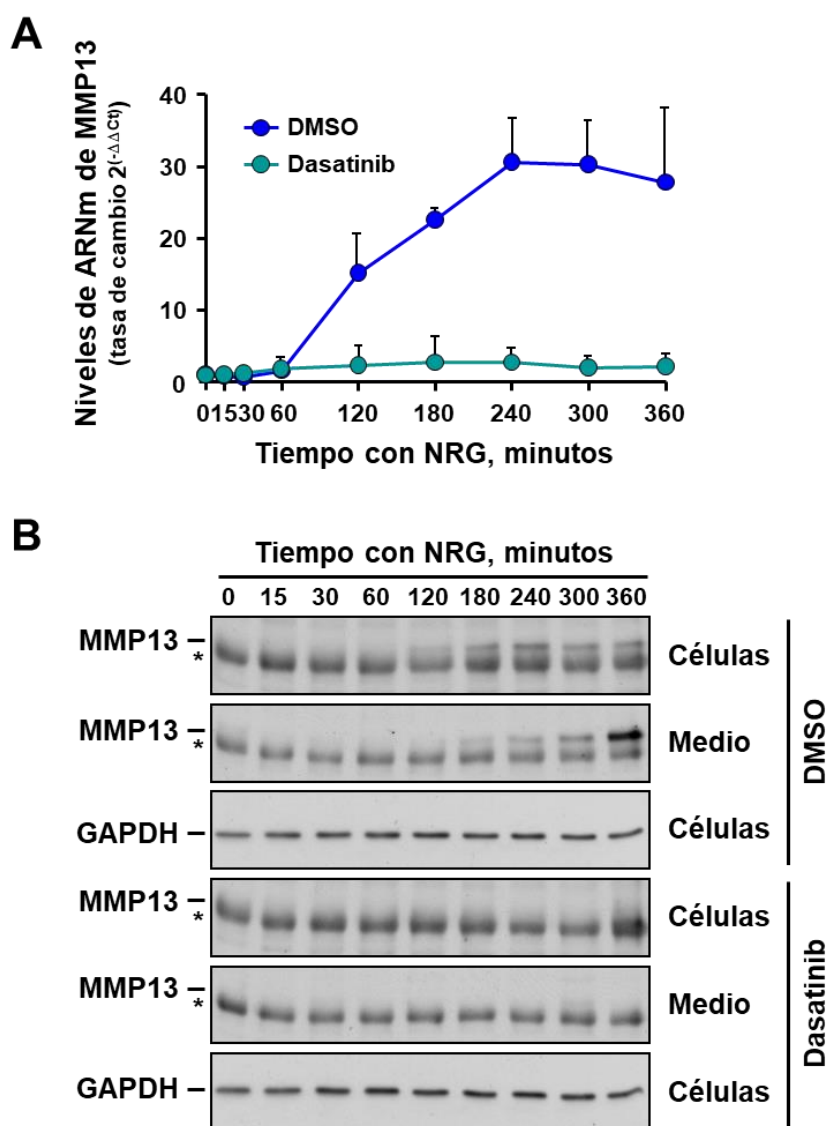


**Figura 13. Efecto de la dosis de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG.** Las células MCF7 se trataron con las concentraciones indicadas de dasatinib durante 3 horas o con DMSO y se estimularon o no con NRG. Después de la estimulación, MMP13 se inmunoprecipitó de los extractos proteicos celulares y se analizó por WB. La gráfica inferior representa la determinación de la  $IC_{50}$  para la inhibición de MMP13.

### 1.4. Efecto de dasatinib sobre la expresión de *MMP13* inducida tras la estimulación con NRG

Una vez observado el efecto inhibitorio de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG, decidimos analizar si esta inhibición se producía a nivel de la transcripción de *MMP13*. Para ello, las células MCF7 se estimularon con NRG 10 nM durante distintos tiempos (15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos) y, después de la estimulación, realizamos la extracción del ARN total de las células, seguida de la síntesis del ADN complementario por retrotranscripción. La expresión de *MMP13* en todas las condiciones fue analizada mediante qRT-PCR y los niveles de ARN mensajero se relativizaron con los de las células sin estimular. Como ya

había sido descrito previamente en el laboratorio (Seoane *et al.*, 2016), la estimulación con NRG de las células MCF7 produjo un aumento en los niveles de ARN mensajero de *MMP13* (Figura 14A). Este aumento fue detectable a los 120 minutos de la estimulación con NRG y alcanzó su pico máximo a los 240 minutos. Cuando las células MCF7 se trataron previamente con dasatinib, tuvo lugar el bloqueo de la transcripción de *MMP13* después de la estimulación con NRG (Figura 14A). Los niveles de ARN mensajero de *MMP13* observados durante todos los tiempos de estimulación fueron similares a los de las células sin estimular.



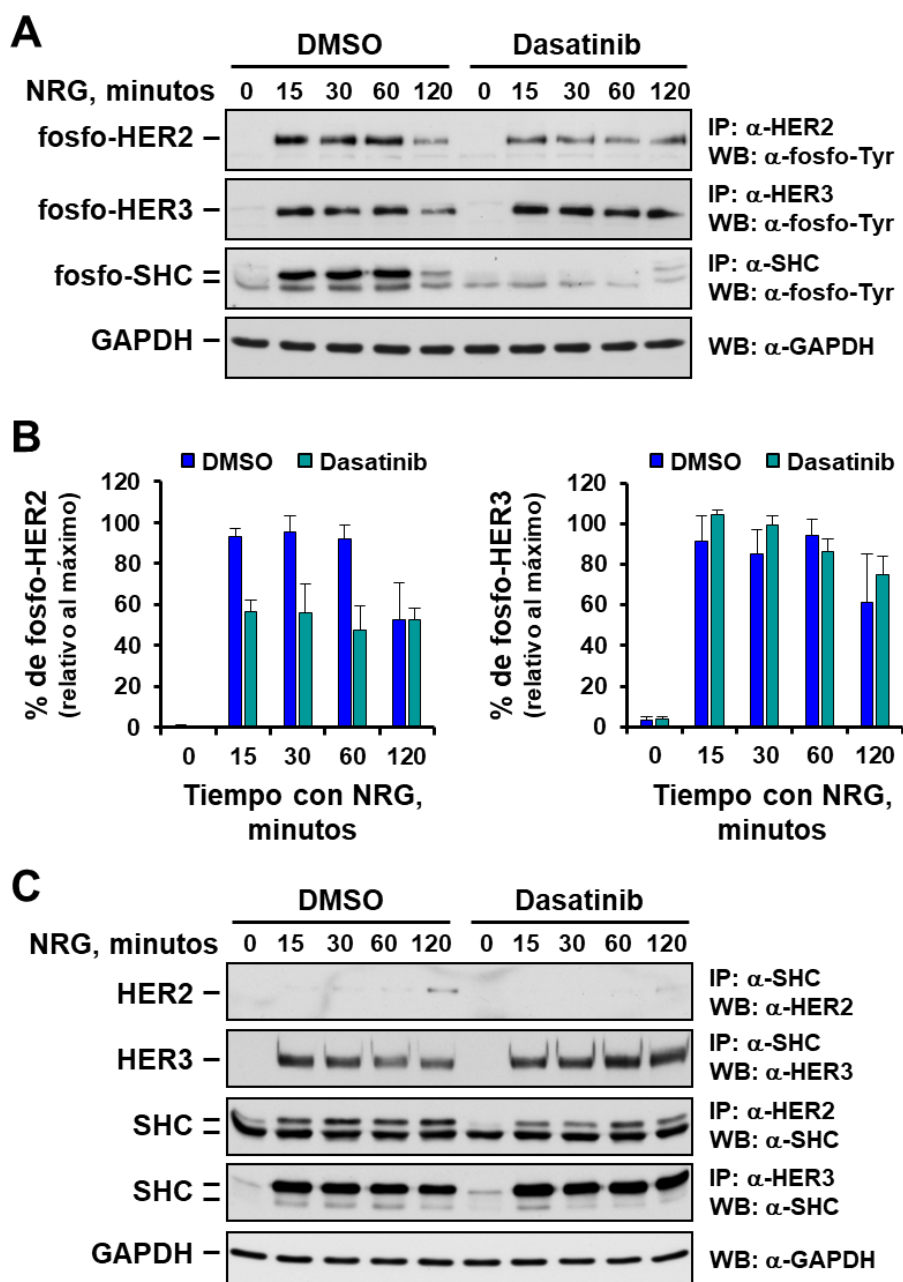
**Figura 14. Análisis del efecto de dasatinib sobre la expresión de *MMP13* inducida tras la estimulación con NRG.** (A) Las células MCF7 se trataron con dasatinib 1  $\mu$ M durante 3 horas o con 0,1 % de DMSO y, a continuación, se estimularon o no con NRG. La expresión de *MMP13* se analizó por qRT-PCR. La gráfica representa los niveles de ARN mensajero (ARNm) de *MMP13*, que se normalizaron con los de *GAPDH* y se relativizaron con los de las células sin estimular. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes. (B) Las células MCF7 se trataron y se estimularon como en (A). Después de lisar las células, los niveles de MMP13 de los extractos proteicos celulares (células) y de los medios de cultivo (medio) se analizaron mediante IP seguida de WB. Los asteriscos indican la cadena pesada del anticuerpo empleado para la IP de MMP13.

Estos datos nos permitieron confirmar que dasatinib inhibía la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG a nivel transcripcional. En paralelo, otras células MCF7 fueron estimuladas con NRG de la forma descrita anteriormente y se lisaron para analizar los niveles de MMP13 a lo largo del tiempo de estimulación mediante IP seguida de WB. Los medios de cultivo también se recogieron para analizar los niveles de MMP13 presentes en los mismos. El análisis de la acumulación de la proteína tanto en los lisados celulares como en el medio de cultivo tras la estimulación de las células con NRG fue consistente con los datos obtenidos mediante qRT-PCR (Figura 14). La producción de MMP13 se observó en los lisados celulares a los 120 minutos de la estimulación con NRG y también alcanzó el máximo de acumulación a los 240 minutos (Figura 14B). En el medio de cultivo la presencia de MMP13 se observó a los 180 minutos de la estimulación con NRG y fue acumulativa con el tiempo. El tratamiento previo con dasatinib bloqueó la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG (Figura 14B).

## **2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE DASATINIB EN LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR NRG-ERBB/HER EN CÁNCER DE MAMA**

A continuación, decidimos explorar el mecanismo por el cual dasatinib inhibía la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG. Para alcanzar nuestro objetivo, analizamos el estado de activación de distintas proteínas involucradas en la señalización mediada por NRG evaluando sus niveles de fosforilación por WB. En primer lugar, analizamos el estado de activación de los receptores HER2 y HER3 tras la estimulación de las células MCF7 con NRG durante distintos tiempos (15, 30, 60 y 120 minutos). El estado de activación del receptor HER4 no fue analizado debido a que estudios anteriores del laboratorio realizados en las células MCF7 no habían mostrado su activación en respuesta a la estimulación con NRG (Sánchez-Martín y Pandiella, 2012). El tratamiento previo de las células MCF7 con dasatinib tuvo un efecto inhibitorio parcial sobre la fosforilación de HER2 inducida por NRG, pero no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre la activación de HER3 (Figuras 15A y 15B). Además, el tratamiento con dasatinib inhibió la fosforilación de las dos isoformas de menor tamaño (46 y 52 kDa) de la proteína adaptadora SHC (Figura 15A) tras la estimulación con NRG. Teniendo en cuenta estos datos, nos planteamos explorar si el tratamiento con dasatinib podía estar inhibiendo la interacción entre los receptores y SHC en respuesta a la estimulación con NRG. Para ello, realizamos ensayos de co-IP seguidos de WB. La estimulación de las células MCF7 con NRG provocó la asociación de SHC con HER2 y también la asociación de SHC con HER3, aunque la cantidad de SHC que interaccionó con HER2 fue menor que la que interaccionó con HER3 (Figura 15C). El tratamiento previo de las células con dasatinib no afectó a la interacción entre SHC y HER3, aunque sí afectó levemente a la interacción entre SHC y HER2 (Figura 15C). Por consiguiente, mientras que dasatinib ejerció un efecto inhibitorio profundo sobre la

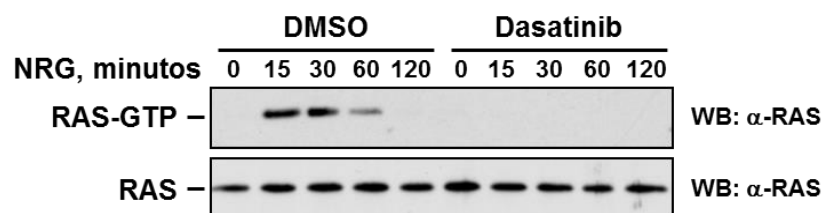
fosforilación de SHC inducida tras la estimulación con NRG, no afectó aparentemente a la habilidad de SHC para interactuar con HER3 y afectó levemente a la interacción entre SHC y HER2.



**Figura 15. Efecto de dasatinib sobre la fosforilación e interacción de los receptores ERBB/HER y de la proteína adaptadora SHC inducidas por NRG.** Las células MCF7 se trataron con dasatinib 1  $\mu$ M durante 3 horas o con 0,1 % de DMSO y se estimularon o no con NRG durante los tiempos indicados. (A) Los niveles de fosforilación de HER2, HER3 y SHC se analizaron mediante IP seguida de WB con un anticuerpo anti-fosfo-tirosina. (B) Representación gráfica de la cuantificación de la fosforilación de HER2 y HER3 después de la estimulación con NRG durante los tiempos indicados. Los datos se relativizaron con la fosforilación máxima de las células tratadas previamente con DMSO y se expresan como la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. (C) La interacción de SHC con HER2 y HER3 después de la estimulación con NRG se analizó mediante co-IP seguida de WB.

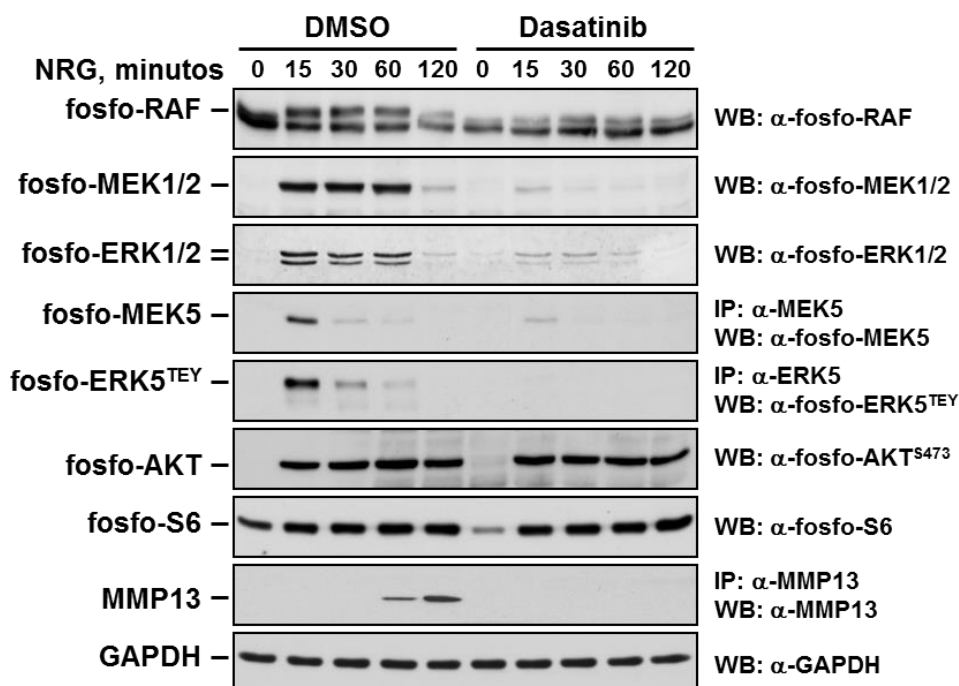
A continuación, analizamos el efecto de dasatinib sobre la activación de la proteína RAS en respuesta a la estimulación con NRG mediante ensayos de precipitación de RAS-GTP seguidos de WB.

Estos experimentos nos permitieron observar que el tratamiento previo de las células MCF7 con dasatinib inhibía la activación de RAS en respuesta a la estimulación con NRG (Figura 16).



**Figura 16. Análisis del efecto de dasatinib sobre la activación de RAS inducida por NRG.** Las células MCF7 se procesaron como se indica en la figura 15. Después de la estimulación con NRG, se analizaron los niveles de activación de RAS mediante precipitación de RAS-GTP seguida de WB. Los niveles de RAS total se evaluaron como control de carga de las muestras.

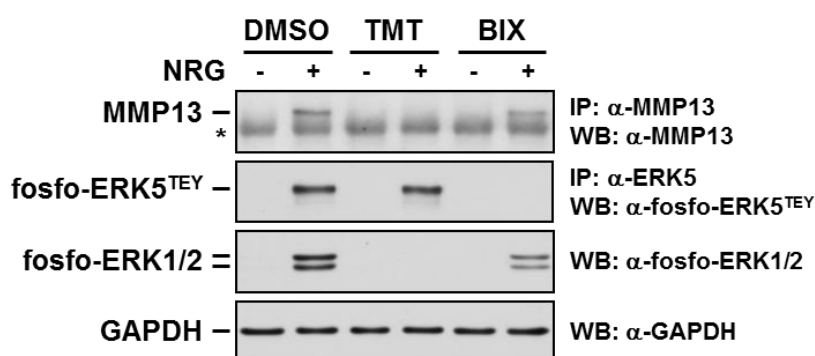
Una vez observada la inhibición de la activación de RAS en respuesta a la estimulación con NRG por dasatinib, continuamos analizando el estado de activación de RAF, MEK1/2 y ERK1/2 evaluando sus niveles de fosforilación mediante WB. Consecuentemente con los datos obtenidos anteriormente, el tratamiento previo de las células MCF7 con dasatinib inhibió la activación de RAF, MEK1/2 y ERK1/2 tras la estimulación con NRG (Figura 17).



**Figura 17. Efecto de dasatinib sobre la fosforilación de proteínas implicadas en la señalización desencadenada por NRG.** Las células MCF7 se procesaron según se indica en la figura 15. Los niveles de fosfo-RAF, fosfo-MEK1/2, fosfo-ERK1/2, fosfo-AKT y fosfo-S6 se analizaron por WB. Los niveles de fosfo-MEK5, fosfo-ERK5 y MMP13 se analizaron mediante IP seguida de WB.

Además de activar la vía de RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2, las NRGs también activan las vías de ERK5 y de PI3K-AKT-mTOR (Esparís-Ogando *et al.*, 2002; Montero *et al.*, 2011b; Seoane *et al.*, 2016). Por consiguiente, evaluamos el estado de activación de algunas proteínas pertenecientes a estas vías de señalización a través del análisis de sus niveles de fosforilación mediante WB. El tratamiento

con dasatinib inhibió la fosforilación de ERK5 en su microdominio de activación TEY en respuesta a la estimulación con NRG, así como la fosforilación de MEK5, que actúa como la quinasa activadora de ERK5 (Figura 17). Como lectura de la activación de las vías de mTORC1 y mTORC2 se analizó la fosforilación de S6 y de AKT, respectivamente. En contraposición con los resultados descritos anteriormente, el tratamiento previo de las células MCF7 con dasatinib no afectó a la activación de S6 ni de AKT tras la estimulación con NRG (Figura 17). Para continuar explorando la contribución de las vías de ERK1/2 y de ERK5 en la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG, decidimos utilizar inhibidores de cada una de las vías. Como inhibidor de la vía de ERK1/2 elegimos el fármaco trametinib, que regula la actividad de las quinasas MEK1/2 (Gilmartin *et al.*, 2011), mientras que como inhibidor de la vía de ERK5 seleccionamos el inhibidor BIX02189, que actúa sobre MEK5 inhibiendo su actividad catalítica (Tatake *et al.*, 2008). El tratamiento previo de las células MCF7 con trametinib bloqueó la activación de ERK1/2 sin afectar a la vía de ERK5 y, además, mostró un efecto inhibitorio sobre la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG (Figura 18). Estos resultados confirmaron la participación de la vía de ERK1/2 en la regulación de la producción de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación con NRG, como se había observado anteriormente en el laboratorio (Seoane *et al.*, 2016). El tratamiento previo de las células MCF7 con BIX02189 inhibió totalmente la activación de ERK5 y ejerció un pequeño efecto inhibitorio en la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG (Figura 18), sugiriendo un papel predominante de la vía de ERK1/2 sobre la vía de ERK5 como intermediarios en la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG. Sin embargo, el tratamiento previo de las células con BIX02189 también inhibió parcialmente la activación de ERK1/2 (Figura 18), por lo que los resultados obtenidos no nos permitieron confirmar si el efecto inhibitorio ejercido por BIX02189 sobre la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG era debido a la inhibición de la vía de ERK5, a la inhibición de la vía de ERK1/2 o a la inhibición de ambas vías.



**Figura 18. Efecto de trametinib o BIX02189 sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG.** Las células MCF7 se trataron con trametinib (TMT) 1  $\mu$ M, con BIX02189 (BIX) 10  $\mu$ M o con 0,1 % de DMSO durante 3 horas y, a continuación, se estimularon con NRG durante 15 minutos (fosfo-ERK5 y fosfo-ERK1/2) o 4 horas (MMP13). Después de la estimulación, se analizaron los niveles de MMP13 y fosfo-ERK5 mediante IP seguida de WB, y los de fosfo-ERK1/2 por WB.

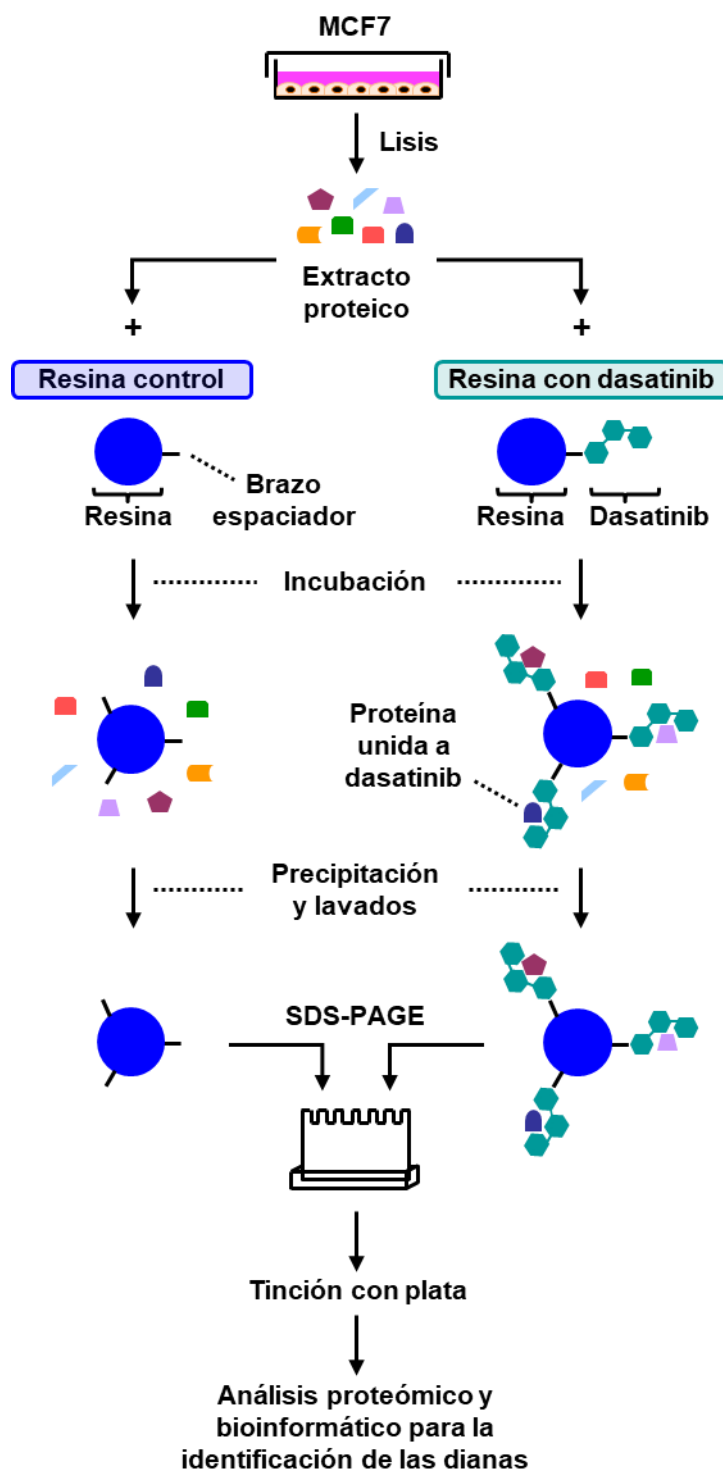
### **3. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A DASATINIB EN CÁNCER DE MAMA**

#### **3.1. Identificación de las proteínas de unión a dasatinib en las células MCF7 mediante quimio-proteómica**

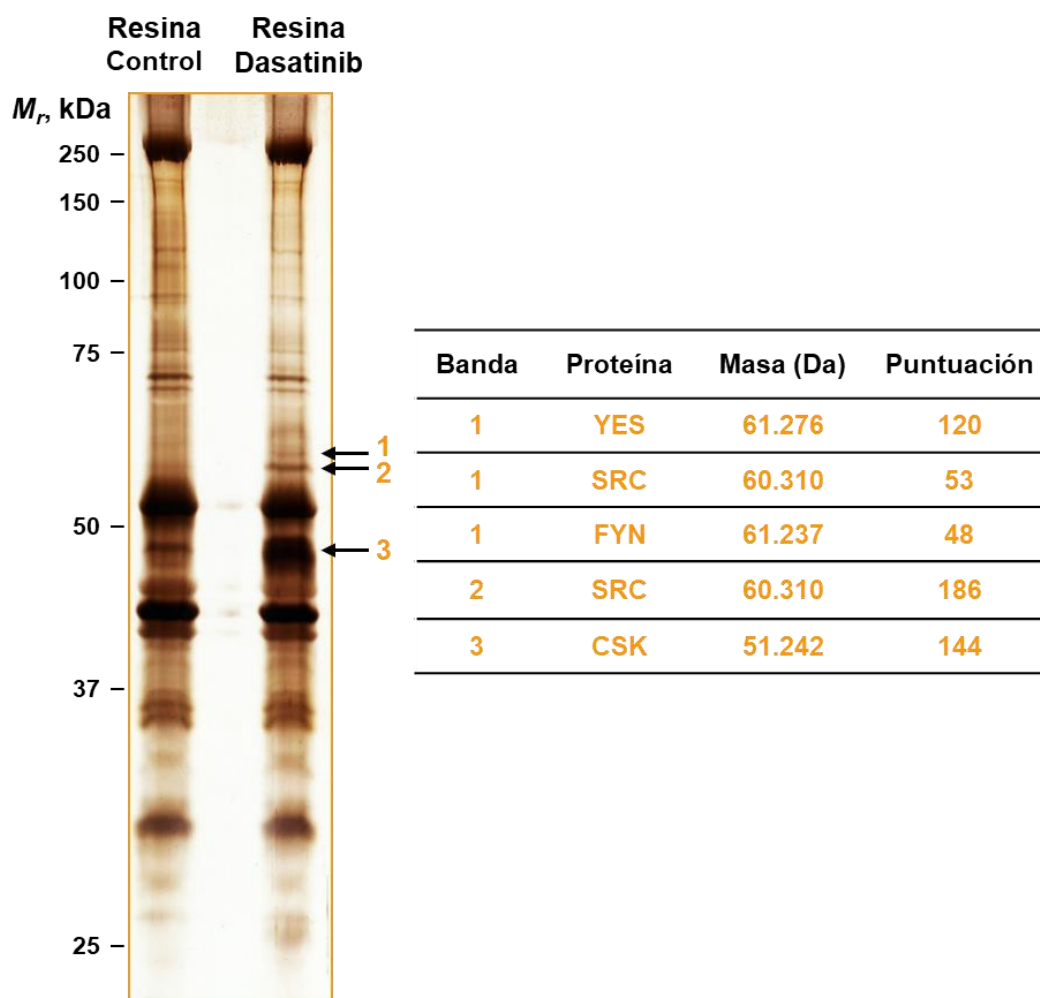
Para seguir explorando el mecanismo por el cual dasatinib ejercía su efecto inhibitorio en la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG, nos propusimos identificar dianas potenciales de dasatinib en las células MCF7. Para alcanzar este objetivo, empleamos una aproximación de quimio-proteómica, que se resume de forma esquemática en la figura 19. En primer lugar, dasatinib se inmovilizó sobre sefarosa y la resina resultante se utilizó como un agente de afinidad para identificar proteínas de unión a dasatinib en las células MCF7. Para ello, el extracto proteico de las células MCF7 se incubó con la resina con dasatinib. Como control de uniones no específicas a la resina, el extracto proteico de las células MCF7 se incubó de forma paralela con la resina sin acoplar al fármaco (resina control). Los complejos resultantes formados por las resinas junto con las proteínas unidas a las mismas se precipitaron por centrifugación y se lavaron para eliminar las uniones poco específicas. Las proteínas unidas a las resinas se resolvieron mediante SDS-PAGE seguida de tinción con plata del gel de poliacrilamida. Las bandas correspondientes a las proteínas que interaccionaban específicamente con la resina con dasatinib se recortaron del gel y se enviaron al Servicio de Proteómica del CIC-IBMCC para identificar las proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF. Las masas peptídicas experimentales obtenidas se compararon con las masas peptídicas teóricas de proteínas presentes en la base de datos Swiss-Prot utilizando el motor de búsqueda Mascot.

Después de teñir el gel de poliacrilamida con plata y de realizar la comparación del patrón de bandas, observamos tres bandas de peso molecular aparente de 65, 63 y 40 kDa, respectivamente, que interaccionaban específicamente con la resina con dasatinib (Figura 20). El análisis proteómico reveló que la banda de 65 kDa podía corresponder con las proteínas YES, SRC o FYN; la banda de 63 kDa con SRC, y la de 40 kDa con CSK (Figura 20). Los resultados obtenidos de los experimentos de quimio-proteómica identificaron a las tirosina quinasas SRC, CSK, YES y FYN como las proteínas de unión a dasatinib más prominentes en las células MCF7.





**Figura 19. Representación esquemática de la aproximación de quimio-proteómica llevada a cabo para identificar proteínas de unión a dasatinib en las células MCF7.** El extracto proteico de las células MCF7 se incubó con la resina control o con la resina acoplada a dasatinib. A continuación, los complejos resina-proteínas de unión resultantes se precipitaron por centrifugación, se lavaron y se resolvieron mediante SDS-PAGE. Después de teñir el gel de poliacrilamida con plata, las bandas de interés correspondientes a las proteínas que interaccionaban específicamente con la resina con dasatinib se recortaron del gel y, después de digerirlas con tripsina, se analizaron mediante MALDI-TOF.

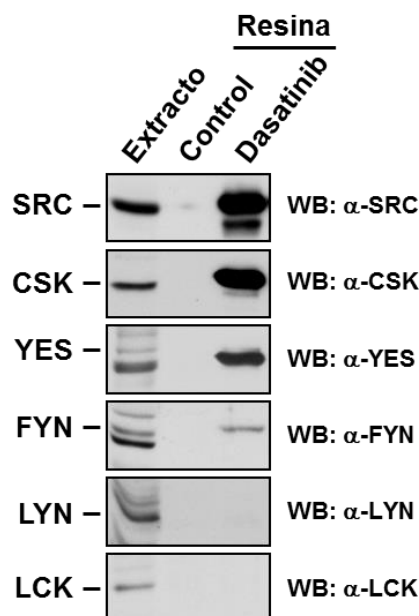


**Figura 20. Identificación de las proteínas de unión a dasatinib en las células MCF7 mediante quimio-proteómica.** Después de resolver los complejos resina-proteínas de unión (obtenidos según se indica en la figura 19) mediante SDS-PAGE, el gel de poliacrilamida se tiñó con plata y se observaron tres bandas de interés que interactuaban específicamente con la resina con dasatinib. Estas bandas se recortaron del gel y las proteínas de las mismas se analizaron por MALDI-TOF. En la tabla de la derecha se muestran las principales proteínas identificadas en las tres bandas empleando la base de datos Swiss-Prot, junto con sus pesos moleculares y las probabilidades calculadas por Mascot.  $M_r$  se refiere a masa molecular (kDa).

### 3.2. Validación de las proteínas de unión a dasatinib identificadas en las células MCF7 mediante experimentos de precipitación

Para validar la identificación de las quinasas SRC, CSK, YES y FYN como proteínas retenidas por la resina con dasatinib, realizamos experimentos de precipitación con las resinas seguidos de WB. El extracto proteico de las células MCF7 se incubó con la resina control o con la resina con dasatinib y los complejos resultantes resina-proteínas de unión se precipitaron por centrifugación, como se ha indicado anteriormente. A continuación, los complejos precipitados se lavaron para eliminar las uniones poco específicas y la presencia de SRC, CSK, YES y FYN en ambas resinas se analizó por WB. Debido a que SRC, YES y FYN son miembros de la familia SRC de tirosina quinasas o quinasas de la familia SRC (SFks, *SRC family kinases*), como control negativo del experimento evaluamos si LYN y LCK, otras quinasas pertenecientes a la misma familia, eran

retenidas o no por la resina con dasatinib. Los resultados obtenidos confirmaron que SRC, CSK, YES y FYN eran proteínas que se unían a la resina con dasatinib, pero no a la resina control (Figura 21). La cantidad de cada una de las proteínas unida a la resina con dasatinib fue sustancial para todas ellas, menos para FYN (Figura 21). No detectamos unión de LYN ni de LCK a la resina con dasatinib, de acuerdo con la ausencia de identificación de estas proteínas en los experimentos previos de quimio-proteómica (Figuras 20 y 21).

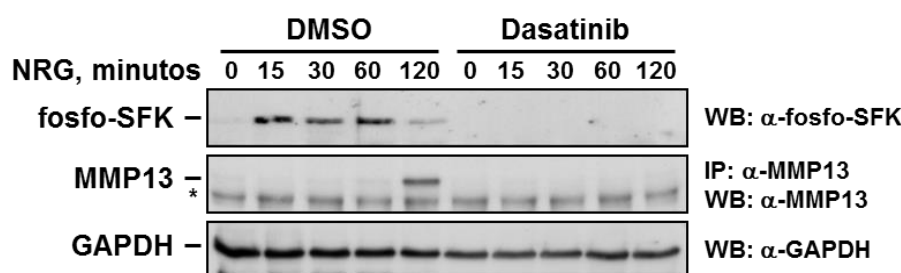


**Figura 21. Análisis de la interacción de SRC, CSK, YES, FYN, LYN y LCK con dasatinib mediante precipitación seguida de WB.** Se incubaron 2 mg de extracto proteico de las células MCF7 con la resina control o acoplada a dasatinib. Los complejos resina-proteínas de unión resultantes se precipitaron por centrifugación, se lavaron y se analizaron por WB empleando diferentes anticuerpos que reconocían a SRC, CSK, YES, FYN, LYN y LCK. Además, se cargó una muestra de extracto proteico de 80 µg en el mismo gel para detectar los niveles totales de las proteínas y demostrar el correcto funcionamiento de los anticuerpos.

#### 4. ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA SRC DE TIROSINA QUINASAS Y DE CSK EN LA PRODUCCIÓN DE MMP13

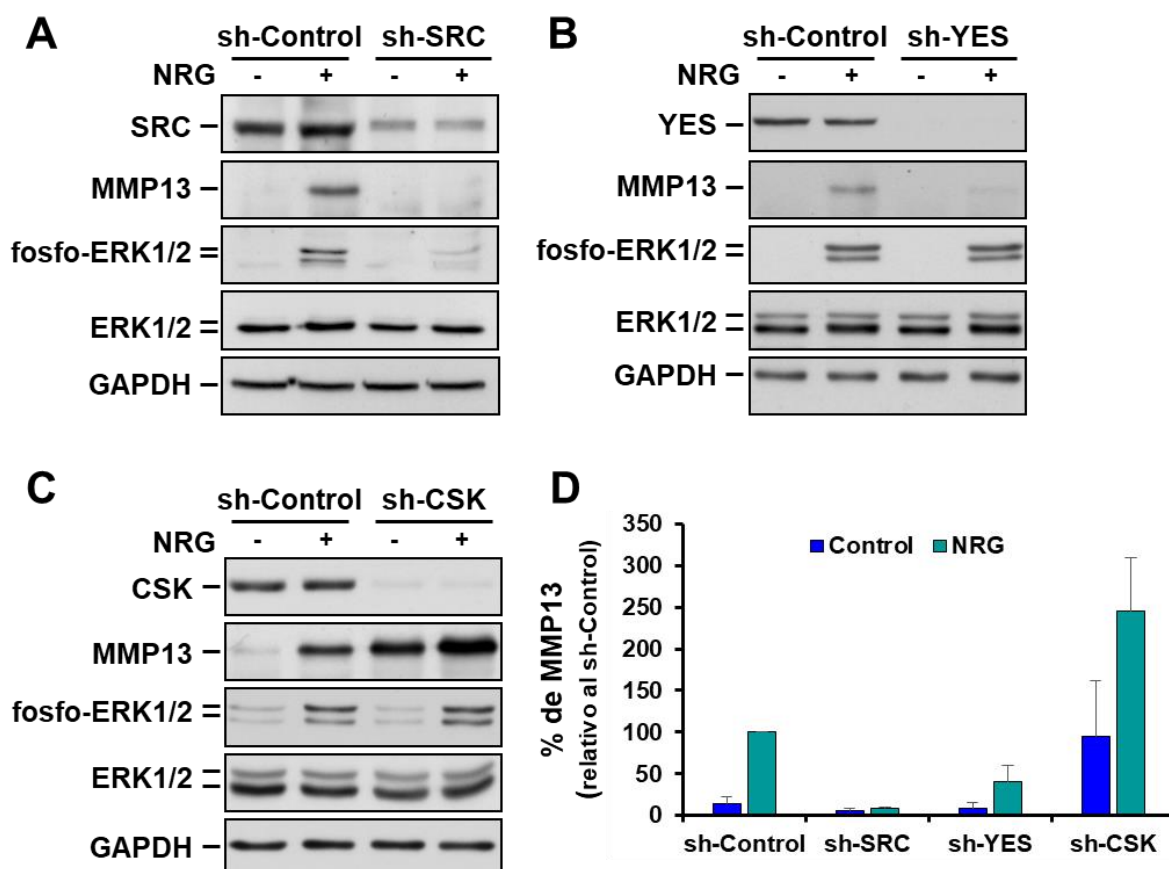
Una vez identificadas algunas SFKs como proteínas de unión a dasatinib, nos propusimos como siguiente objetivo explorar la contribución de las mismas como intermediarios en el control de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG. En primer lugar, analizamos mediante WB si la estimulación de las células con NRG producía la activación de las SFKs identificadas. Para ello, empleamos un anticuerpo fosfo-específico que reconocía las formas activas de distintas SFKs, entre las que se encontraban SRC, YES y FYN. Del mismo modo, también analizamos el efecto de dasatinib sobre el estado de activación de las SFKs en respuesta a la estimulación con NRG. Como control positivo de los experimentos, evaluamos los niveles de MMP13 mediante IP seguida de WB. La estimulación de las células MCF7 que habían sido tratadas previamente con DMSO produjo la fosforilación de las SFKs reconocidas por el anticuerpo, que fue acompañada de la inducción de la producción de MMP13 (Figura 22). El tratamiento previo de las células MCF7 con dasatinib inhibió completamente la fosforilación de las SFKs inducida tras la estimulación con NRG en la región

reconocida por este anticuerpo, así como la producción de MMP13 (Figura 22). Estos resultados confirmaron la participación de las SFKs como intermediarios en el control de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG.



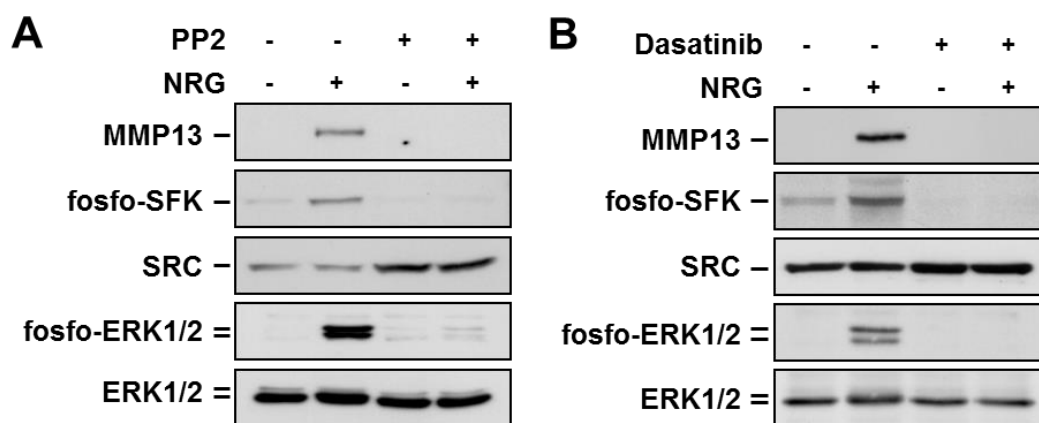
**Figura 22. Efecto de dasatinib sobre la activación de las SFKs en respuesta a la estimulación con NRG.** Las células MCF7 se procesaron como se indica en la figura 15 y, a continuación, se analizaron los niveles de fosfo-SFKs por WB. Los niveles de MMP13 se analizaron mediante IP seguida de WB.

Para definir el papel de las distintas SFKs en este proceso, decidimos silenciar la expresión de los genes codificantes de cada una de las SFKs identificadas como proteínas de unión a dasatinib, utilizando vectores lentivirales que contenían secuencias de shRNA dirigidas contra ellos. El análisis de la participación de FYN no se llevó a cabo debido a la baja interacción observada previamente entre esta proteína y la resina con dasatinib (Figura 21). Siguiendo el mismo método que acabamos de comentar, silenciamos también la expresión de CSK para explorar su contribución en la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG. Las dos secuencias de shRNA evaluadas para cada proteína generaron resultados análogos, aunque solo presentamos los datos obtenidos con una de ellas. El silenciamiento de SRC inhibió la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG (Figuras 23A y 23D) y, además, redujo la fosforilación de ERK1/2 (Figura 23A). El silenciamiento de YES1 también inhibió la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG (Figuras 23B y 23D), aunque esta inhibición fue menor que la observada por el silenciamiento de SRC (Figura 23D). Sin embargo, el silenciamiento de YES1 no afectó a la fosforilación de ERK1/2 tras la estimulación con NRG (Figura 23B). El silenciamiento de CSK resultó en un aumento de los niveles de MMP13 en las células sin estimular con NRG (Figuras 23C y 23D). Sorprendentemente, este aumento en los niveles de MMP13 no fue acompañado de un aumento en la fosforilación de ERK1/2 (Figura 23C). La estimulación de las células con NRG produjo un aumento adicional en los niveles de MMP13 (Figuras 23C y 23D) que tampoco fue acompañado de un aumento en la fosforilación de ERK1/2 (Figura 23C).



**Figura 23. Análisis del efecto del silenciamiento de *SRC*, *YES1* y *CSK* sobre la regulación de fosfo-ERK1/2 y de MMP13 tras la estimulación con NRG.** Las células MCF7 se infectaron con lentivirus que contenían la secuencia de un shRNA dirigido contra (A) *SRC* (sh-SRC), (B) *YES1* (sh-YES) o (C) *CSK* (sh-CSK) o de un shRNA control (sh-Control) y, posteriormente, se estimularon con NRG durante 15 minutos (fosfo-ERK1/2 y ERK1/2) o 4 horas (MMP13). (D) Gráfica de barras representando la cuantificación del efecto del silenciamiento de *SRC*, *YES1* y *CSK* sobre los niveles de MMP13. Los datos se relativizaron con los niveles de MMP13 de las células MCF7 transducidas con el sh-Control y estimuladas con NRG, y se representan como la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes.

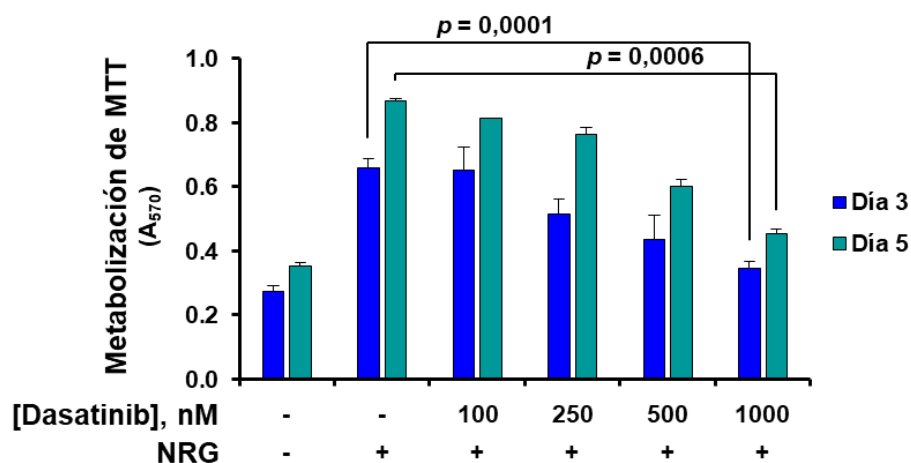
Finalmente, decidimos comparar la efectividad de dasatinib con la de PP2, un inhibidor alternativo de las SFKs (Hanke *et al.*, 1996). El tratamiento previo de las células MCF7 con PP2 inhibió la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG, así como la activación de las SFKs y de ERK1/2 sin reducir los niveles totales de SRC o de ERK1/2 (Figura 24A). Este efecto inhibitorio observado con PP2 fue similar al observado con dasatinib (Figura 24B), confirmando una vez más la participación de las SFKs como intermediarios en el control de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG. Curiosamente, los tratamientos con PP2 y con dasatinib no solo no disminuyeron los niveles totales de SRC, sino que incluso produjeron un aumento en los mismos (Figura 24).



**Figura 24.** Efecto de PP2 y de dasatinib sobre la activación de las SFKs y sobre la producción de MMP13 inducidas tras la estimulación con NRG. Las células MCF7 se trataron con (A) PP2 10  $\mu$ M, con (B) dasatinib 1  $\mu$ M o con 0,1 % de DMSO durante 3 horas y, a continuación, se estimularon o no con NRG durante 15 minutos (fosfo-SFKs, SRC, fosfo-ERK1/2 y ERK1/2) o 4 horas (MMP13).

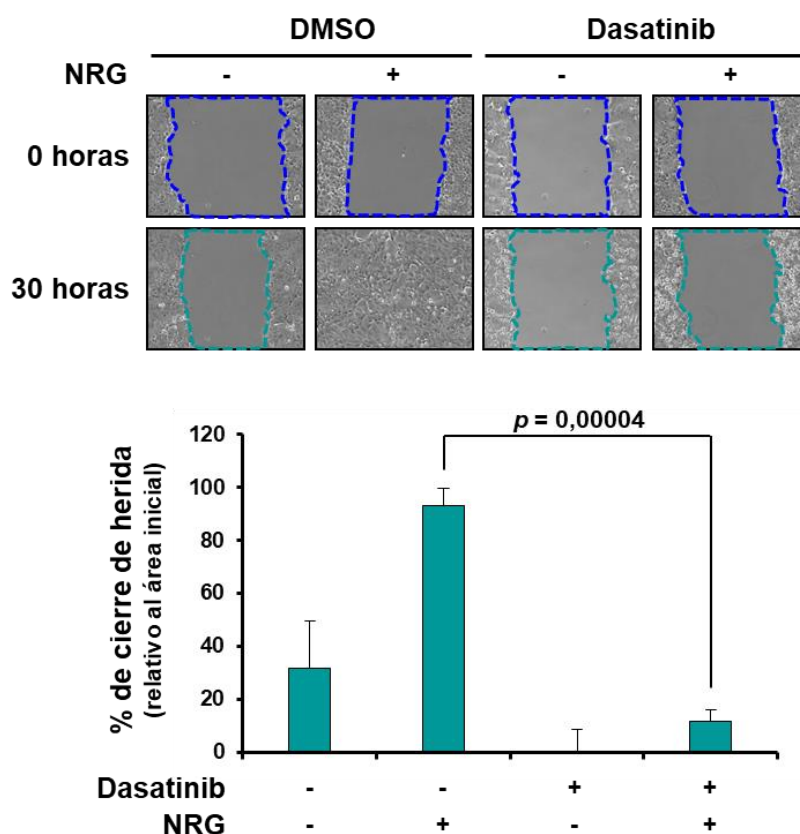
## 5. EFECTO DE DASATINIB SOBRE LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR INDUCIDAS POR NRG EN CÁNCER DE MAMA

Para evaluar si el tratamiento con dasatinib afectaba a la proliferación celular inducida por NRG, las células MCF7 se trataron con distintas concentraciones de dasatinib (100, 250, 500 y 1000 nM) durante 3 horas y se estimularon con NRG 10 nM. Después de 3 y 5 días, la proliferación celular se analizó mediante ensayos de metabolización de MTT. La estimulación con NRG de las células MCF7 produjo el aumento de su proliferación (Figura 25). Sin embargo, el tratamiento previo con dasatinib disminuyó su proliferación en respuesta a la estimulación con NRG (Figura 25).



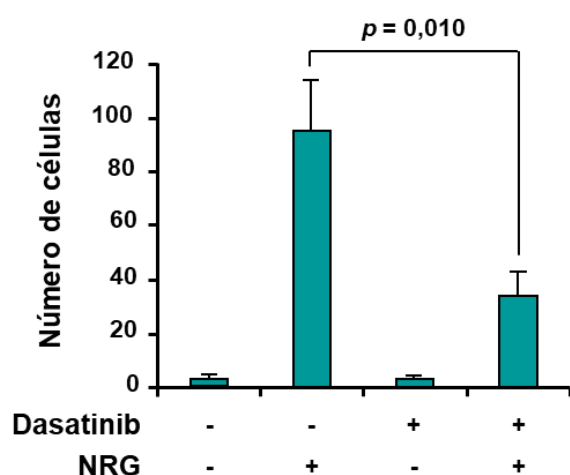
**Figura 25.** Análisis del efecto de dasatinib sobre la proliferación de las células MCF7 inducida por NRG. Las células se trataron con dasatinib a las concentraciones indicadas o con DMSO y se estimularon con NRG durante 3 o 5 días. La proliferación celular se determinó mediante ensayos de metabolización de MTT. La gráfica de barras representa la metabolización de MTT como la media  $\pm$  SD de los triplicados de un experimento representativo que se repitió tres veces. Las comparaciones de las medias entre dos grupos independientes se realizaron con una prueba *t* de Student.

Para explorar el efecto de dasatinib sobre la migración celular inducida por NRG, llevamos a cabo ensayos de cierre de herida. La estimulación de las células MCF7 con NRG promovió un aumento de la migración celular (Figura 26). El tratamiento previo de las células con dasatinib redujo la migración de las mismas en condiciones basales y en respuesta a la estimulación con NRG (Figura 26).



**Figura 26. Efecto de dasatinib sobre la migración de las células MCF7 en respuesta a la estimulación con NRG.** Las imágenes de las heridas se adquirieron en el momento de la adición de NRG (tiempo 0 horas) y a las 30 horas de estimulación. La gráfica de barras inferior representa la cuantificación del área de la herida cubierta después de 30 horas de estimulación con NRG, que se relativizó con el área de la herida inicial (tiempo 0 horas). Las imágenes son representativas de un experimento que se repitió tres veces y los datos se presentan como la media  $\pm$  SD de los triplicados del mismo. La comparación de las medias entre dos grupos independientes se realizó con una prueba *t* de Student.

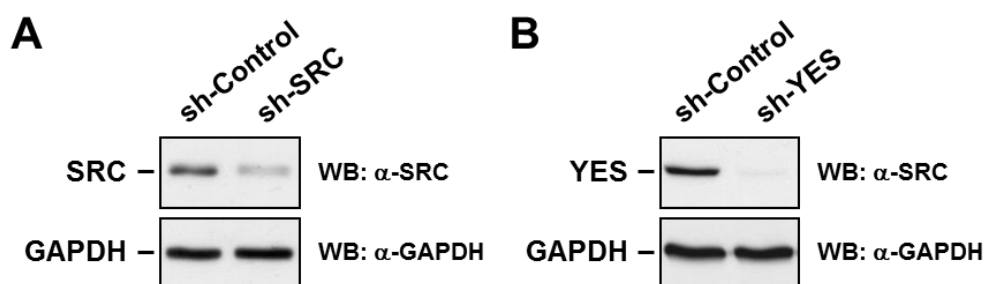
Para estudiar si el tratamiento con dasatinib afectaba a la invasión celular inducida por NRG, realizamos ensayos de invasión en *transwell*, que previamente se habían cubierto con una capa de matrigel. La estimulación de las células MCF7 con NRG promovió su invasión a través del matrigel (Figura 27). El tratamiento previo de las células con dasatinib también disminuyó el número de las mismas capaces de invadir a través del matrigel en respuesta a la estimulación con NRG (Figura 27).



**Figura 27. Análisis del efecto de dasatinib sobre la invasión de las células MCF7 en respuesta a la estimulación con NRG.** Representación gráfica del número de células que invadieron a través del matrigel a las 48 horas de estimulación con NRG. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SD de los triplicados de un experimento representativo que se repitió tres veces. La comparación de las medias entre dos grupos independientes se realizó con una prueba *t* de Student.

## 6. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE *SRC* Y DE *YES1* SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR INDUCIDAS POR NRG Y MEDIADAS POR MMP13

Tras identificar a *SRC* y a *YES* como intermediarios en el control de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG, y de observar que dasatinib inhibía estos procesos, investigamos si el silenciamiento de *SRC* o de *YES1* tenía las mismas propiedades antimetastásicas que el fármaco. Una vez confirmado el silenciamiento génico evaluando los niveles de *SRC* (Figura 28A) y de *YES* (Figura 28B) por WB, analizamos la migración y la invasión celular mediante ensayos de cierre de herida o de invasión en *transwell*, respectivamente.

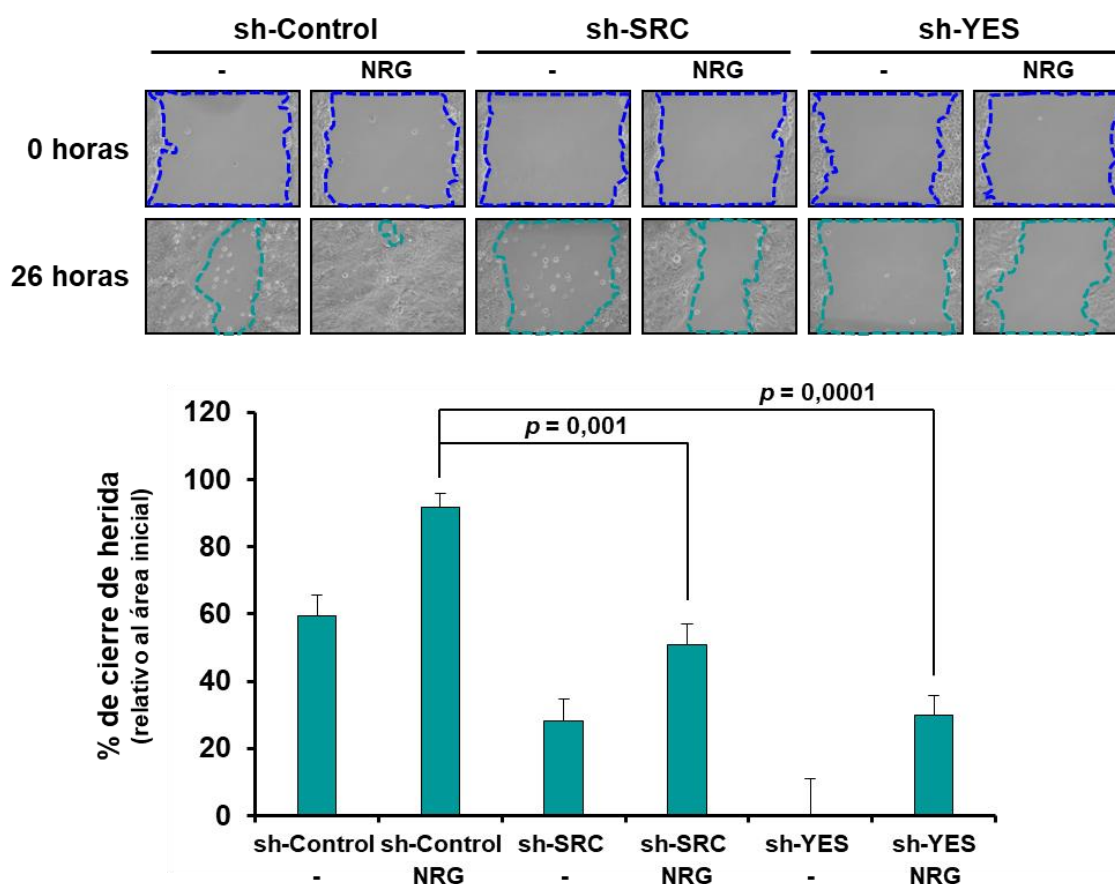


**Figura 28. Análisis de la eficacia del silenciamiento de *SRC* y de *YES1*.** WBs de las células MCF7 infectadas con lentivirus que contenían la secuencia de un shRNA dirigido contra (A) *SRC* (sh-*SRC*) o (B) *YES1* (sh-*YES*) o de un shRNA control (sh-Control).

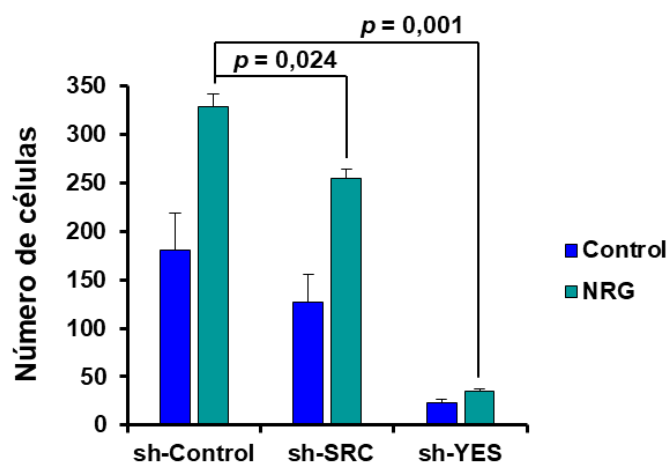
Los ensayos de cierre de herida llevados a cabo revelaron que el silenciamiento de *SRC* reducía la migración de las células MCF7 en condiciones basales y en respuesta a la estimulación con NRG (Figura 29). Del mismo modo, el silenciamiento de *YES1* también redujo la migración de las células MCF7 en condiciones basales y después de la estimulación con NRG (Figura 29). En línea con estos resultados, el silenciamiento de *SRC* disminuyó el número de células MCF7 capaces de invadir a través del matrigel en condiciones basales y en respuesta a la estimulación con NRG (Figura 30).



Asimismo, el silenciamiento de *YES1* también redujo el número de células MCF7 capaces de invadir a través de la capa de matrigel en condiciones basales y tras la estimulación con NRG (Figura 30).



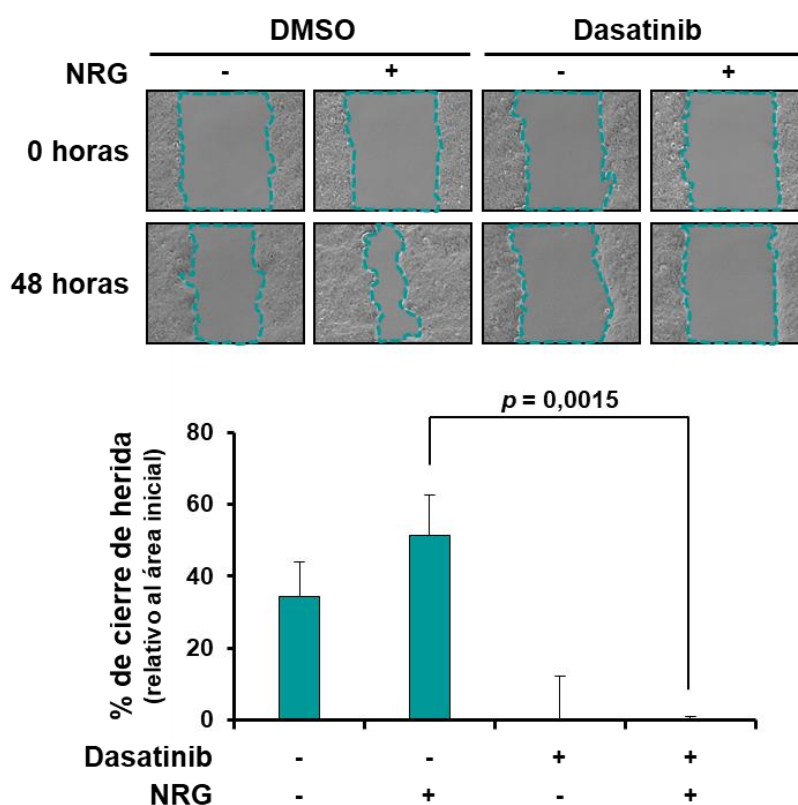
**Figura 29. Efecto del silenciamiento de *SRC* y de *YES1* sobre la migración celular en respuesta a la estimulación con NRG.** Las imágenes de las heridas se adquirieron después de la estimulación de las células MCF7 con NRG (tiempo 0 horas) y transcurridas 26 horas. La gráfica de barras inferior representa la cuantificación del área de la herida cubierta a las 26 horas de estimulación con NRG, que se relativizó con el área de la herida inicial (tiempo 0 horas). Las imágenes son representativas de un experimento que se realizó tres veces y los datos se presentan como la media  $\pm$  SD de los triplicados del mismo experimento. Las comparaciones de las medias entre dos grupos independientes se realizaron con una prueba  $t$  de Student.



**Figura 30. Efecto del silenciamiento de *SRC* y de *YES1* sobre la invasión celular en respuesta a la estimulación con NRG.** Representación gráfica del número de células MCF7 que invadieron a través del matrigel después de 72 horas de estimulación con NRG. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SD de los triplicados de un experimento representativo que fue repetido tres veces. Las comparaciones de las medias entre dos grupos independientes se realizaron con una prueba  $t$  de Student.

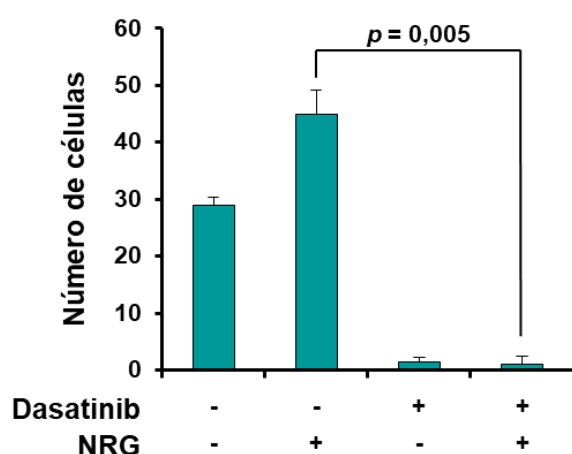
## 7. EFECTO DE DASATINIB SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR INDUCIDAS POR NRG Y MEDIADAS POR MMP13 EN OTRO MODELO CELULAR DE CÁNCER DE MAMA

Una vez analizado el efecto de dasatinib sobre las respuestas biológicas inducidas por NRG y mediadas por MMP13 en nuestro modelo celular de estudio, quisimos explorar si el eje de señalización NRG-MMP13 podría tener el mismo papel en el control de la diseminación celular en otros modelos celulares de cáncer de mama y si dasatinib podría ejercer el mismo efecto. Para alcanzar nuestro objetivo, elegimos la línea celular BT474 y analizamos la migración celular y la invasión mediante ensayos de cierre de herida o de invasión en *transwell*, respectivamente. El motivo para elegir esta línea celular fue que había mostrado la mayor inducción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG, en nuestros estudios previos (Figura 12).



**Figura 31. Efecto de dasatinib sobre la migración de las células BT474 en respuesta a la estimulación con NRG.** Las imágenes de las heridas se adquirieron en el momento de la adición de NRG (tiempo 0 horas) y después de 48 horas de estimulación. La gráfica de barras inferior representa la cuantificación del área de la herida cubierta a las 48 horas de estimulación con NRG, que se relativizó con el área de la herida inicial (tiempo 0 horas). Las imágenes son representativas de un experimento que se repitió tres veces y los datos se presentan como la media  $\pm$  SD de los triplicados del mismo experimento. La comparación de las medias entre dos grupos independientes se realizó con una prueba *t* de Student.

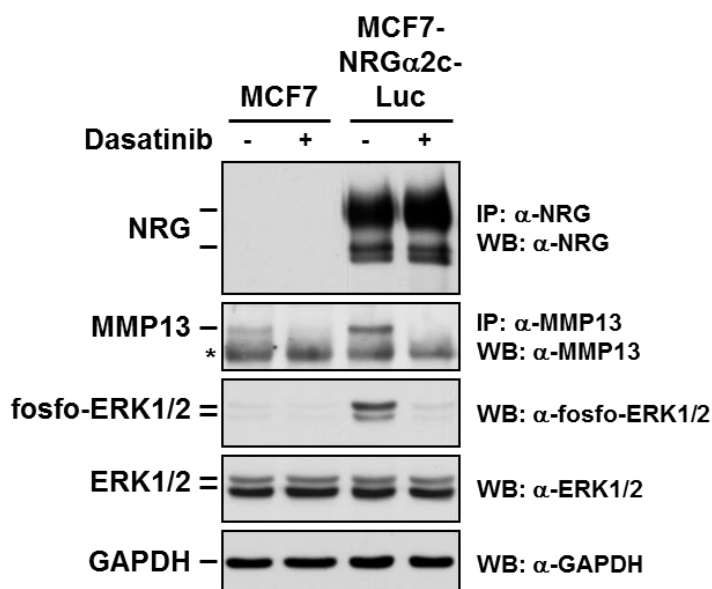
Los ensayos de cierre de herida mostraron que la estimulación de las células BT474 con NRG producía un aumento de la migración celular (Figura 31). Asimismo, el tratamiento previo de las células BT474 con dasatinib redujo la migración de las mismas en condiciones basales y en respuesta a la estimulación con NRG (Figura 31), como habíamos observado anteriormente con las células MCF7. Los ensayos de invasión, por su parte, revelaron que la estimulación de las células BT474 con NRG promovía la invasión de las mismas a través del matrigel (Figura 32). El pretratamiento con dasatinib disminuyó el número de células BT474 capaces de invadir a través del matrigel en respuesta a la estimulación con NRG (Figura 32).



**Figura 32. Efecto de dasatinib sobre la invasión de las células BT474 en respuesta a la estimulación con NRG.** Representación gráfica del número de células que invadieron a través del matrigel después de 48 horas de estimulación con NRG. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SD de los triplicados de un experimento representativo que se repitió tres veces. La comparación de las medias entre dos grupos independientes se realizó con una prueba *t* de Student.

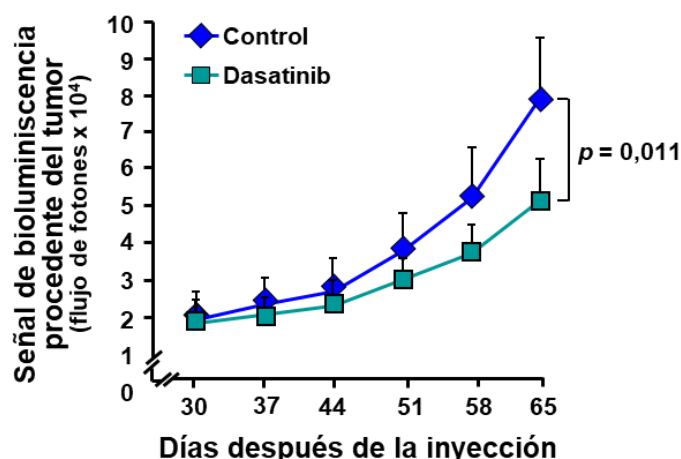
## 8. EFECTO DE DASATINIB SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR, INVASIÓN LOCAL Y DISEMINACIÓN METASTÁSICA INDUCIDAS POR NRG *IN VIVO*

Para evaluar la capacidad de dasatinib para afectar *in vivo* las respuestas biológicas inducidas por NRG, empleamos ratones desnudos a los que inyectamos subcutáneamente las células MCF7-NRG $\alpha$ 2c-Luc (Yuste *et al.*, 2005; Seoane *et al.*, 2016). La producción de NRG $\alpha$ 2c de manera basal en estas células mimetiza la adición de NRG soluble exógena y activa la señalización mediada por NRG-ERBB/HER (Yuste *et al.*, 2005; Seoane *et al.*, 2016). Las células MCF7-NRG $\alpha$ 2c-Luc que habían sido tratadas con DMSO mostraron niveles elevados de NRG, fosfo-ERK1/2 y MMP13 en condiciones basales, y mayores que los de las células MCF7 (Figura 33), que se emplearon como control negativo de la activación basal de la señalización mediada por NRG-ERBB/HER. El tratamiento de las células MCF7-NRG $\alpha$ 2c-Luc con dasatinib inhibió la activación de ERK1/2, así como la producción de MMP13 (Figura 33). Los resultados obtenidos confirmaron que las células MCF7-NRG $\alpha$ 2c-Luc constituían un buen modelo celular para estudiar el efecto de dasatinib en las respuestas biológicas inducidas por NRG *in vivo*.



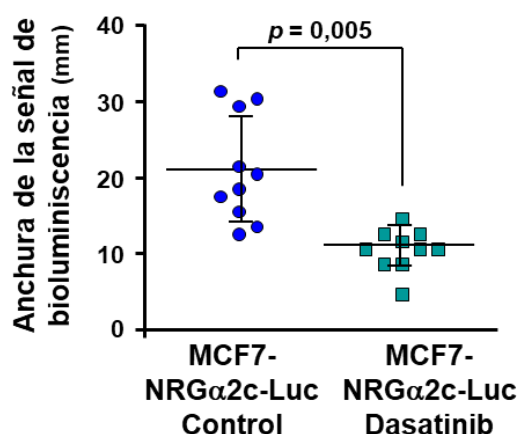
**Figura 33. Análisis de los niveles de NRG, MMP13, fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 en las células MCF7 y MCF7-NRGα2c-Luc mediante WB.** Las células se trataron con dasatinib 1 μM o con 0,1 % de DMSO durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lisaron para analizar los niveles de NRG y MMP13 mediante IP seguida de WB, mientras que los de fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 se analizaron por WB. El asterisco indica la cadena pesada del anticuerpo empleado para la IP de MMP13.

Como hemos mencionado anteriormente, para evaluar el efecto de dasatinib en las respuestas biológicas inducidas por NRG *in vivo*, las células MCF7-NRGα2c-Luc se inyectaron subcutáneamente en la línea mamaria de ratones desnudos, en dos sitios por ratón. El crecimiento de las masas tumorales se siguió periódicamente y cuando los tumores alcanzaron los 100 mm<sup>3</sup> de volumen, lo que ocurrió 30 días después de la inyección de las células, los ratones se dividieron en dos grupos experimentales de cinco individuos cada uno para comenzar el tratamiento. Los ratones de uno de los grupos recibieron diariamente ácido tartárico 25 mM (vehículo control) de manera oral, mientras que los del otro grupo recibieron 10 mg/kg de dasatinib oralmente cada día. Una vez iniciado el tratamiento, el tamaño de los tumores se midió semanalmente de manera indirecta mediante la detección de la emisión del flujo de fotones con un sistema de imagen óptica *in vivo*. En el momento de iniciar el tratamiento no se observó ninguna metástasis en los ratones. Las imágenes de bioluminiscencia adquiridas semanalmente durante cinco semanas de tratamiento nos permitieron observar que el tamaño de los tumores generados en los ratones tratados con dasatinib eran más pequeños que los generados en los ratones tratados con el vehículo control (Figura 34). Estos resultados mostraron que dasatinib reducía la proliferación celular *in vivo* y confirmaron el efecto inhibitorio de dasatinib en este proceso del mismo modo que lo observado *in vitro*.



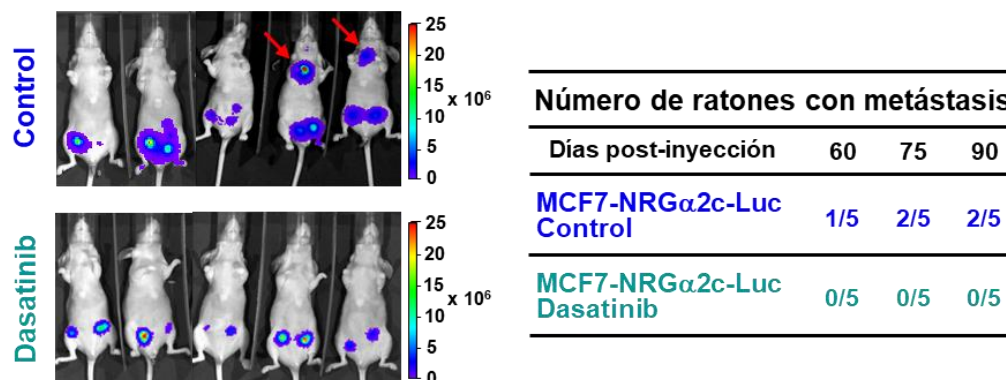
**Figura 34. Efecto de dasatinib sobre la proliferación de los tumores de células MCF7-NRGα2c-Luc *in vivo*.** Representación gráfica del crecimiento tumoral analizado semanalmente durante cinco semanas de tratamiento mediante la detección del flujo de fotones emitido por las masas tumorales con un sistema de imagen IVIS 50. El tratamiento comenzó 30 días después de la inyección de las células MCF7-NRGα2c-Luc y el tamaño de los tumores se midió 15 minutos después de inyectar a los ratones 100 mg/kg de sal de potasio de la D-luciferina en la cavidad peritoneal. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SD de los tumores primarios analizados en cada condición experimental ( $n = 10$ ). La comparación de las medias entre dos grupos independientes se realizó con una prueba  $t$  de Student.

A continuación, quisimos evaluar si el tratamiento con dasatinib además de afectar a la proliferación de las células MCF7-NRGα2c-Luc *in vivo*, podía afectar también a su expansión local. La diseminación local de las células se analizó midiendo la anchura de la señal de bioluminiscencia emitida por la masa tumoral. El análisis se realizó a los 60 días de tratamiento de los ratones (90 días después de la inyección de las células en los ratones), coincidiendo con la finalización del tratamiento de los mismos. Las medidas de la anchura de la señal de bioluminiscencia de los tumores nos permitieron observar que el tratamiento con dasatinib reducía también la diseminación local de las células MCF7-NRGα2c-Luc *in vivo* (Figura 35).



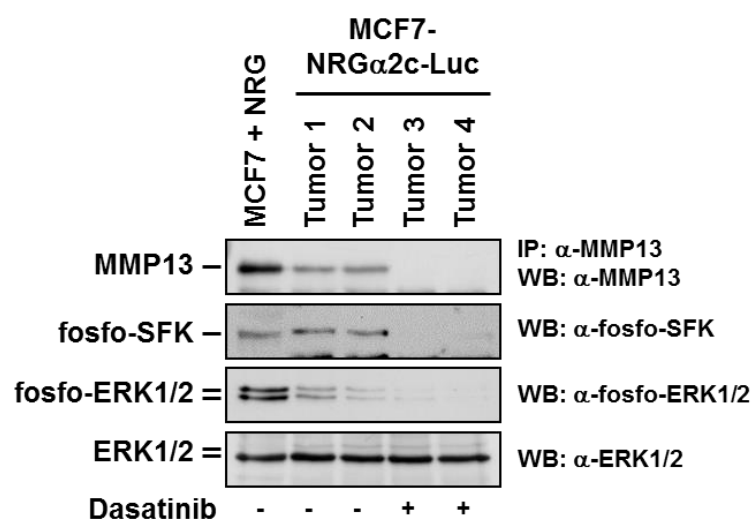
**Figura 35. Efecto de dasatinib sobre la diseminación local de las células MCF7-NRGα2c-Luc *in vivo*.** Representación gráfica de la anchura de la señal de bioluminiscencia de cada tumor primario analizado en cada grupo experimental junto con la media  $\pm$  SD de los mismos ( $n = 10$ ). La comparación de las medias entre los dos grupos independientes se realizó con una prueba  $t$  de Student.

A lo largo de los 60 días de tratamiento de los ratones con el vehículo control (90 días después de la inyección), algunas de las células MCF7-NRG $\alpha$ 2c-Luc inyectadas tuvieron la tendencia de expandirse más allá del sitio de implantación originando tumores secundarios (Figura 36). El tratamiento de los ratones con dasatinib impidió la diseminación metastásica de las células MCF7-NRG $\alpha$ 2c-Luc (Figura 36).



**Figura 36. Efecto de dasatinib sobre la diseminación metastásica de las células MCF7-NRG $\alpha$ 2c-Luc *in vivo*.** Imágenes de bioluminiscencia del cuerpo completo de los ratones inyectados con las células MCF7-NRG $\alpha$ 2c-Luc, que se habían tratado con 10 mg/kg de dasatinib o con ácido tartárico 25 mM (vehículo control) durante 60 días (90 días después de la inyección). Las imágenes se adquirieron como se indica en la figura 34. La barra coloreada como un arco iris a la derecha de las imágenes representa la escala de intensidad de la señal de bioluminiscencia. Las flechas apuntan a dos masas tumorales diseminadas. En la tabla de la derecha se muestra el número de ratones con metástasis en cada grupo experimental a los 60, 75 y 90 días después de la inyección ( $n = 5$  ratones en cada condición experimental).

Una vez observado el efecto inhibitorio de dasatinib *in vivo*, analizamos los niveles de las proteínas de interés en los tumores primarios procedentes de cada grupo experimental. Los niveles de las fosfo-SFKs y de fosfo-ERK1/2 fueron analizados por WB, mientras que los niveles de MMP13 fueron analizados por IP seguida de WB. Como control positivo del experimento empleamos células MCF7 que habían sido estimuladas con NRG 10 nM durante 15 minutos para analizar la activación de las SFKs y de ERK1/2 o durante 4 horas para analizar la inducción de la producción de MMP13. Los tumores procedentes de los ratones que habían sido tratados con el vehículo mostraron la activación de las SFKs y de ERK1/2, así como la inducción de la producción de MMP13 (Figura 37). Sin embargo, en los tumores obtenidos de los ratones que habían sido tratados con dasatinib, el fármaco redujo tanto los niveles de MMP13 como las formas fosforiladas de las SFKs y de ERK1/2 (Figura 37). Todos estos datos confirmaron que dasatinib bloqueaba la diseminación metastásica promovida por NRG y mediada por MMP13 en nuestro modelo *in vivo*.



**Figura 37. Análisis de los niveles de MMP13, fosfo-SFKs y fosfo-ERK1/2 en los tumores primarios de células MCF7-NRGα2c-Luc mediante WB.** Una vez procesados los tumores, los niveles de MMP13 se analizaron por IP seguida de WB, mientras que los de fosfo-SFKs y fosfo-ERK1/2 se analizaron por WB. Las células MCF7 estimuladas con NRG como se describe en la figura 24 se utilizaron como control para la detección de las proteínas. Los niveles de ERK1/2 se utilizaron como control de carga de las muestras.

Los resultados obtenidos en este primer capítulo confirmaron nuestra hipótesis inicial de que dasatinib representa una estrategia terapéutica capaz de inhibir la producción de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación con NRG, bloqueando la diseminación metastásica promovida por estos ligandos de la familia de receptores ERBB/HER en cáncer de mama.





## V. DISCUSIÓN

---



## 1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE DASATINIB EN LA DISEMINACIÓN METASTÁSICA PROMOVIDA POR NRG Y MEDIADA POR MMP13 EN CÁNCER DE MAMA

La diseminación metastásica constituye una condición patológica crítica en cáncer de mama, que puede determinar una evolución fatal de la enfermedad. Por este motivo, es de vital importancia definir los mecanismos responsables de la diseminación metastásica en cáncer de mama con el objetivo de encontrar estrategias terapéuticas para poder prevenirla o para tratar las metástasis una vez formadas. Actualmente muchos grupos de investigación están realizando numerosos esfuerzos para profundizar en estos mecanismos responsables de la diseminación metastásica en cáncer de mama. Algunos de los estudios realizados por nuestro grupo han mostrado que la expresión de las NRGs en cáncer de mama está ligada a una mala respuesta de las pacientes, como consecuencia de una mayor diseminación metastásica (Seoane *et al.*, 2016). Los análisis transcriptómicos y funcionales llevados a cabo en estos estudios apuntaron a la metaloproteasa MMP13 como un mediador relevante en la diseminación metastásica inducida por NRG en cáncer de mama (Seoane *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta estos resultados, uno de los objetivos principales de este trabajo de tesis doctoral fue encontrar una estrategia terapéutica que pudiera inhibir la producción de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación con NRG para bloquear la diseminación metastásica promovida por estos ligandos de la familia de receptores ERBB/HER en cáncer de mama.

Como punto de partida, nos centramos en aquellos compuestos que estuvieran aprobados para su uso en la práctica clínica, por ser los más adecuados para facilitar su posterior desarrollo clínico. Dasatinib es un TKI aprobado para su uso en el tratamiento de leucemia mieloide crónica y de leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Lindauer y Hochhaus, 2010; Keating, 2017). Distintos antecedentes apuntaron a este inhibidor como un candidato atractivo para impedir la diseminación metastásica inducida por NRG y mediada por MMP13 en cáncer de mama. Por un lado, se había descrito que dasatinib podía inhibir la diseminación metastásica de distintos tipos tumorales. En un modelo ortotópico de cáncer de próstata, el tratamiento con dasatinib redujo la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos de los ratones (Park *et al.*, 2008). De manera análoga, dasatinib disminuyó la diseminación metastásica de células de adenocarcinoma pancreático humano (Trevino *et al.*, 2006). Asimismo, en cáncer de mama el tratamiento con dasatinib redujo la formación de metástasis óseas en los ratones (Zhang *et al.*, 2009). Por otro lado, además, se había mostrado que el tratamiento con dasatinib de células de cáncer de mama sobreexpresoras del receptor HER2 disminuía la activación de las quinasas ERK1/2 (Seoane *et al.*, 2010), las cuales son intermediarios en la vía de señalización que promueve la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG en cáncer de mama (Seoane *et al.*, 2016).

Para explorar el papel de dasatinib en la diseminación metastásica inducida por NRG y mediada por MMP13 en cáncer de mama, comenzamos por evaluar el papel del fármaco sobre la producción de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación con NRG *in vitro*. Para ello, elegimos la línea celular de cáncer de mama MCF7, que constituye un buen modelo para estudiar la señalización mediada por NRG (Seoane *et al.*, 2016). Este modelo de estudio nos permitió mostrar por primera vez que el tratamiento con dasatinib previo a la estimulación de las células de cáncer de mama con NRG inhibía la producción de MMP13 inducida tras la estimulación. Además, también nos permitió describir por primera vez que dasatinib inhibía la activación de las quinasas ERK1/2 en respuesta a la estimulación de los receptores ERBB/HER con NRG en células de cáncer de mama. Sin embargo, la inhibición de ERK1/2 después del tratamiento con dasatinib ya se había mostrado previamente en células de cáncer de mama en las que la señalización a través de los receptores ERBB/HER estaba activada de manera basal por la sobreexpresión del receptor HER2 (Seoane *et al.*, 2010).

El efecto inhibitorio de dasatinib sobre la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG también se observó en otras líneas celulares de cáncer de mama empleadas. Es relevante destacar que, además, estas líneas celulares pertenecían a distintos subtipos histológicos de cáncer de mama, por lo que el efecto inhibitorio del fármaco sobre este proceso no era específico ni de la línea celular, ni del subtipo histológico. Mientras que las células T47D, en las que se observó el efecto de dasatinib, son positivas para receptores hormonales, al igual que las células MCF7, el efecto de dasatinib también se observó en las células BT474 y SKBR3, que pertenecen al subtipo HER2 positivo. La ausencia de receptores HER2 y HER3 en las líneas celulares BT549, HCC3153 y MDAMB231, pertenecientes al subtipo triple negativo, impidió la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación de las células con NRG. Sin embargo, no pudimos establecer una relación entre los niveles de los receptores ERBB/HER de las líneas celulares incluidas en el estudio y los de MMP13 inducidos tras la estimulación de las células con NRG. La mayor inducción de la producción de MMP13 se observó en las células MCF7, que presentan niveles normales tanto del receptor HER2 como de los otros receptores de la familia (Holmes *et al.*, 1992), mientras que fueron seguidas por las células BT474, que son sobreexpresoras de HER2. Además, la menor inducción de la producción de MMP13 se observó en las células T47D, que presentan características similares a las células MCF7, en cuanto a niveles de los receptores ERBB/HER y a su capacidad para responder mitogénicamente a la adición de NRG exógena soluble (Seoane *et al.*, 2016).

Los experimentos de expresión génica llevados a cabo en las células MCF7 revelaron que el tratamiento de las mismas con dasatinib inhibía la síntesis del ARN mensajero de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG. Para obtener información sobre el mecanismo responsable del efecto

inhibitorio de dasatinib sobre la producción de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación con NRG en cáncer de mama, analizamos las vías de señalización activadas por NRG en las células MCF7. El análisis de las vías de señalización activadas por NRG mostró que dasatinib ejercía un efecto muy pequeño sobre la fosforilación de los residuos de tirosina de los receptores ERBB/HER y, por lo tanto, sobre su activación. La fosforilación del receptor HER2 inducida tras la estimulación de las células con NRG se vio ligeramente inhibida por el tratamiento previo con dasatinib, mientras que la fosforilación de HER3 observada en respuesta a la estimulación con NRG no se vio inhibida por el tratamiento. El análisis del efecto de dasatinib sobre la fosforilación de los residuos de tirosina del receptor HER4 no se llevó a cabo debido a que estudios previos de nuestro grupo realizados en la misma línea celular no mostraron la activación de HER4 en respuesta a la estimulación de las células con NRG (Sánchez-Martín y Pandiella, 2012). El ligero efecto inhibitorio producido por dasatinib sobre la fosforilación de HER2 podía estar indicando la participación de alguna de las dianas de dasatinib en la fosforilación de los residuos de tirosina del receptor. De hecho, otros autores han sugerido que SRC podría fosforilar a HER2 en la tirosina 877 después de observar que el tratamiento previo de las células con PP2 inhibía la fosforilación de la misma en respuesta a la estimulación con NRG (Ishizawa *et al.*, 2007). En contraste con el efecto marginal observado sobre la fosforilación de los receptores ERBB/HER en respuesta a la estimulación con NRG, el tratamiento con dasatinib ejerció un efecto inhibitorio fuerte en la señalización próxima a los receptores, desencadenada por la fosforilación de los residuos de tirosina de los mismos (Olayioye *et al.*, 2000; Yarden y Sliwkowski, 2001; Schlessinger, 2004). En concreto, la fosforilación de las dos isoformas de menor tamaño de la proteína adaptadora SHC (46 y 52 kDa) inducida tras la estimulación con NRG se vio inhibida por el tratamiento previo con dasatinib. Esta inhibición fue especialmente llamativa en el caso de la isoforma de mayor tamaño. Una posible explicación para el efecto inhibitorio de dasatinib sobre la fosforilación de los residuos de tirosina de SHC era que el fármaco estuviera afectando a la interacción entre la proteína adaptadora SHC y los receptores ERBB/HER, ya que esta interacción precede a la fosforilación de SHC por los receptores y por otras quinasas (Ravichandran, 2001). Los experimentos de co-IP llevados a cabo mostraron que el tratamiento con dasatinib inhibía ligeramente la interacción entre HER2 y la proteína adaptadora SHC tras la estimulación con NRG, mientras que la interacción entre HER3 y la proteína adaptadora SHC no se vio inhibida por el tratamiento. El efecto de dasatinib sobre la interacción entre SHC y los receptores ERBB/HER en respuesta a la estimulación con NRG se correlacionó con el efecto del fármaco sobre la fosforilación de los receptores en los residuos de tirosina tras la estimulación con NRG, sugiriendo que el nivel de fosforilación del receptor en estos residuos podría estar condicionando su interacción con la proteína adaptadora. Sin embargo, el efecto de dasatinib sobre la interacción entre SHC y los receptores ERBB/HER en respuesta a la estimulación con NRG no pareció explicar el efecto inhibitorio de dasatinib sobre la fosforilación de

SHC observado tras la estimulación con NRG. La participación de alguna de las dianas de dasatinib en la fosforilación de SHC tras la activación de la señalización desencadenada por NRG podría explicar la inhibición de la fosforilación de SHC ejercida por dasatinib. En línea con esta idea, algunos autores han identificado residuos de tirosina en la proteína adaptadora SHC que son fosforilados por SRC y que median interacciones entre proteínas (van der Geer *et al.*, 1996). Por otro lado, los experimentos de co-IP también revelaron que las dos isoformas de SHC tenían preferencias distintas de interacción con los receptores HER2 y HER3, aunque ambas interaccionaban con los dos receptores. Aparentemente, la isoforma de 52 kDa interaccionaba preferentemente con HER3, mientras que la de 46 kDa interaccionaba con HER2 preferentemente. Esta distinta preferencia de interacción entre las isoformas de SHC y los receptores ERBB/HER no se había descrito previamente y requiere estudios adicionales para su caracterización. Como la fosforilación de los residuos de tirosina de la proteína adaptadora SHC inicia mediante su asociación con el complejo GRB2/SOS la señalización a través de RAS (Buday y Downward, 1993; Egan *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993), la inhibición de la fosforilación de SHC por el tratamiento con dasatinib resultó en la inhibición de la activación de RAS en respuesta a la estimulación de las células con NRG. Como consecuencia de la inhibición de la activación de RAS y coherentemente con lo esperado, las fosforilaciones activadoras de RAF, MEK1/2 y ERK1/2 tras la estimulación con NRG también se vieron inhibidas por el tratamiento previo de las células con dasatinib. Además de inhibir la activación de las quinasas ERK1/2, el tratamiento con dasatinib inhibió también la activación de la quinasa ERK5 y la de su quinasa activadora MEK5, en respuesta a la estimulación con NRG. Los experimentos realizados con los inhibidores de las vías de señalización de ERK1/2 y de ERK5 demostraron la efectividad de la inhibición de la vía de ERK1/2 en la prevención de la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG. Sin embargo, el hecho de que el inhibidor de la vía de ERK5 inhibiera parcialmente la activación de ERK1/2, no nos permitió confirmar la implicación de la vía de ERK5 en la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG. La realización de experimentos de silenciamiento génico, en lugar de la utilización de inhibidores, podría ayudarnos a aclarar la implicación de ERK5 en este proceso. La observación de que dasatinib inhibía la producción de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación con NRG, aparentemente a través de la inhibición de las quinasas ERK1/2, fue consistente con los resultados descritos previamente por nuestro grupo, en los que las células MCF7 se trataron con un inhibidor de las quinasas MEK1/2 antes de ser estimuladas con NRG. El tratamiento previo de las células MCF7 con el inhibidor U0126, que inhibe la activación de las quinasas ERK1/2 mediante la inhibición de la actividad de las quinasas MEK1/2 (Favata *et al.*, 1998), bloqueó también la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG (Seoane *et al.*, 2016). Además, nuestro grupo también había descrito anteriormente que el tratamiento de las células MCF7 con U0126 inhibía la síntesis del ARN mensajero de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación

con NRG (Seoane *et al.*, 2016). De manera que, los resultados obtenidos en este trabajo de los experimentos de expresión génica fueron coherentes con los obtenidos previamente en nuestro grupo, al mostrar nuevamente que la activación de las quinasas ERK1/2 era necesaria para la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG a nivel transcripcional. Como las NRGs también activan la vía de PI3K-AKT, analizamos el efecto de dasatinib sobre la activación de la misma evaluando los niveles de fosforilación de AKT y de S6. El tratamiento con dasatinib no ejerció ningún efecto sobre los niveles de las formas fosforiladas de AKT y de S6, indicando que dasatinib no afectaba a la vía de PI3K-AKT y que, además, esta vía no estaba involucrada en la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG. Estos resultados fueron consistentes con los datos descritos previamente por nuestro grupo en los que el tratamiento de las células MCF7 con el inhibidor de PI3K LY294002 antes de ser estimuladas con NRG no afectó a la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación (Seoane *et al.*, 2016). Asimismo, el hecho de que la vía de PI3K-AKT no estuviera inhibida por dasatinib, apoyaba indirectamente el concepto de que la señalización proximal de los receptores ERBB/HER, tal como la unión del ligando al receptor, la dimerización de los receptores o la transfosforilación entre ellos, no estaba resultando afectada por el fármaco.

Dasatinib fue aislado inicialmente como un inhibidor dual de SRC y de ABL (Lombardo *et al.*, 2004). La capacidad de dasatinib para inhibir ABL es la que ha permitido su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y de la leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Lindauer y Hochhaus, 2010; Keating, 2017). Sin embargo, además de estas dianas, dasatinib inhibe la actividad de otras proteínas tirosina quinasas tanto receptores como no receptores (Karaman *et al.*, 2008). Para continuar explorando el mecanismo responsable del efecto inhibitorio de dasatinib sobre la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG en cáncer de mama, nos propusimos identificar las dianas de dasatinib en nuestra línea celular modelo de estudio a través de una aproximación de quimio-proteómica. Estos estudios identificaron a las tirosina quinasas SRC, YES, CSK y FYN como las proteínas de unión a dasatinib en las células MCF7, indicando que dasatinib podía estar ejerciendo su acción inhibitoria sobre la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG a través de ellas y que, por consiguiente, podían ser intermediarios de señalización en este proceso. Mientras que las dianas SRC, YES y FYN pertenecen a la misma familia de proteínas tirosina quinasas (SFKs), la tirosina quinasa CSK está estrechamente relacionada con ellas como regulador negativo de su actividad, a través de la fosforilación del residuo de tirosina inhibitorio de su extremo C-terminal (Nada *et al.*, 1991; Okada *et al.*, 1991). Todas las dianas de dasatinib identificadas en las células MCF7 fueron validadas bioquímicamente y, además, habían sido descritas previamente entre las dianas más sensibles de dasatinib (Karaman *et al.*, 2008). Es importante mencionar que la ausencia de identificación de otras dianas descritas de dasatinib en las

células MCF7 podría deberse tanto a la falta de expresión de las mismas en estas células como a problemas inherentes a la técnica relacionados con la ionización de los péptidos analizados por espectrometría de masas. En este segundo lugar, los resultados obtenidos a través de la aproximación de proteómica química no permitirían descartar la existencia de otras dianas de dasatinib en las células MCF7, que no hubieran sido identificadas. Además, también es relevante comentar que aunque se ha descrito que CSK se puede unir directamente a dasatinib (Karaman *et al.*, 2008; Rix *et al.*, 2007), nuestros resultados no nos permitieron excluir si CSK estaba retenida en la resina con dasatinib indirectamente a causa de su interacción con las SFKs (Vielreicher *et al.*, 2007).

De todas las dianas de dasatinib identificadas en las células MCF7, la tirosina quinasa SRC había sido implicada previamente en el proceso de diseminación metastásica de las células de cáncer de mama. Por un lado, algunos autores han descrito una asociación fuerte entre la actividad de SRC y las metástasis óseas de inicio tardío en una cohorte de 600 pacientes de cáncer de mama (Zhang *et al.*, 2009). Además, estos autores demostraron que SRC favorece la supervivencia de las células de cáncer de mama en el microambiente de la médula ósea al facilitar la señalización a través de CXCL12-CXCR4-AKT y al conferir resistencia al ligando de muerte celular TRAIL (Zhang *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha descrito que la activación de SRC juega un papel clave en la interrupción de la barrera hematoencefálica, promoviendo las metástasis cerebrales por cáncer de mama (Zhang *et al.*, 2013). Asimismo, los otros miembros de la familia SRC identificados también habían sido implicados anteriormente en el proceso de diseminación metastásica, aunque en otros tipos de cáncer. Algunos autores han revelado que la tirosina quinasa YES incrementa el potencial metastásico de las células de cáncer de próstata a través de la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK, *focal adhesion kinase*) (Chatterji *et al.*, 2015). Otros trabajos han correlacionado la expresión elevada de FYN con la metástasis de cáncer de páncreas (Chen *et al.*, 2010). Por último, como la tirosina quinasa CSK es un regulador negativo de las SFKs (Okada *et al.*, 1991), su sobreexpresión en células de cáncer de colon inhibe la diseminación metastásica de las células al pulmón (Nakagawa *et al.*, 2000).

Una vez identificadas algunas SFKs como proteínas de unión a dasatinib, exploramos la contribución de las mismas como intermediarios de señalización en la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG. Los experimentos realizados mostraron la activación de las SFKs en respuesta a la estimulación de las células con NRG, confirmando la participación de las mismas en el control de la producción de MMP13 en respuesta a NRG. Sin embargo, la estrategia empleada para la realización de estos ensayos consistió en la utilización de un anticuerpo fosfo-específico que reconocía la forma activa de las SFKs, sin permitirnos distinguir ni la activación ni la contribución individual de cada una de ellas. A pesar de esta limitación, la estrategia fue válida para observar también que el tratamiento previo de las células con dasatinib inhibía la activación de las



SFKs tras la estimulación con NRG. La identificación de algunas SFKs como intermediarios en la señalización mediada por NRG a través de los receptores de la familia ERBB/HER en cáncer de mama y, en particular, de la tirosina quinasa SRC estaría apoyada por los estudios previos que han reportado la asociación entre HER2 y SRC en células de cáncer de mama (Muthuswamy *et al.*, 1994; Sheffield, 1998; Belsches-Jablonski *et al.*, 2001). La interacción entre ambas proteínas depende tanto de la fosforilación de las tirosinas de la cola citoplasmática de HER2 como del dominio SH2 de SRC (Luttrell *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2005), resultando en un aumento de la actividad de SRC (Muthuswamy *et al.*, 1994). Otros estudios han descrito el papel de SRC en la regulación de la formación de los heterodímeros HER2/HER3, de manera que SRC favorece la asociación entre los receptores y la activación de la señalización a través de los mismos (Ishizawar, Miyake and Parsons, 2007). Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, el hecho de que en nuestra línea celular modelo de estudio la activación de la vía de PI3K-AKT en respuesta a la estimulación con NRG no estuviera afectada por el tratamiento previo de las células con dasatinib estaría indicando que la heterodimerización de los receptores HER2/HER3 tampoco está afectada por el fármaco.

Para explorar la contribución individual de las dianas de dasatinib identificadas en las células MCF7 como intermediarios de señalización en la inducción de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG, realizamos experimentos de silenciamiento génico para los genes codificantes de cada una de las dianas identificadas, con la excepción de LYN. La participación de LYN como intermediario de señalización fue descartada debido a la escasa interacción entre esta proteína y la resina acoplada a dasatinib, observada en la validación bioquímica de las dianas. Los experimentos del silenciamiento génico de *SRC* mostraron la disminución de la activación de ERK1/2, junto con la inhibición de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG, confirmando la participación de SRC en la producción de MMP13 inducida tras la estimulación con NRG. El análisis del silenciamiento génico de *YES1* también mostró la inhibición de MMP13 tras la estimulación con NRG, aunque la inhibición fue menor que la observada por el silenciamiento génico de *SRC*. Sorprendentemente, el silenciamiento génico de *YES1* no afectó a la activación de ERK1/2 tras la estimulación con NRG. Este resultado fue particularmente relevante ya que los datos previos obtenidos en nuestro grupo habían identificado a la vía de ERK1/2 como la responsable del control de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG (Seoane *et al.*, 2016). Sin embargo, YES estaría participando en la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG de manera independiente de la vía de ERK1/2, sugiriendo la implicación de otras vías en el control de MMP13. De hecho, este resultado se vio reforzado por los datos obtenidos con el silenciamiento génico de *CSK*. El silenciamiento génico de *CSK* produjo un aumento de los niveles de MMP13 en las células sin estimular con NRG, indicando que CSK se trataba de regulador negativo de la producción de MMP13 en condiciones basales. Una vez más, este aumento en los niveles de MMP13 no fue

acompañado de un aumento en la fosforilación de ERK1/2, lo que sugirió que CSK participaba en la regulación de la producción de MMP13 de forma independiente de la vía de ERK1/2 en condiciones basales. La estimulación de las células con NRG produjo un aumento adicional de los niveles de MMP13 que tampoco fue acompañado de un aumento en la fosforilación de ERK1/2, de manera que CSK también participaba en el control de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG de manera independiente de la vía de ERK1/2. Todos estos resultados confirmaron y describieron por primera vez la participación de SRC, YES y CSK como intermediarios de señalización en la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG en cáncer de mama. Sin embargo, también pusieron de manifiesto que además de la vía de ERK1/2 tenía que haber otras vías implicadas en la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG. Mientras que SRC estaría participando en la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG a través de la vía de ERK1/2, YES estaría participando en el mismo proceso a través de una vía independiente de ERK1/2. Además, la tirosina quinasa CSK también participaría en el control de la producción de MMP13 tanto en condiciones basales como en respuesta a la estimulación con NRG, de manera independiente de la vía de ERK1/2. Los resultados obtenidos mostraron la complejidad del control de la producción de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación con NRG. De hecho, en línea con los resultados comentados anteriormente, la vía de ERK5 podría ser una de las implicadas en la inducción de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG. En este sentido, YES o CSK podrían estar actuando como intermediarios de señalización de la vía de ERK5. La implicación de la vía de ERK5 o la identificación de otras vías de señalización implicadas en el control de MMP13 tras la estimulación con NRG requieren estudios adicionales. Curiosamente, la participación de las SFKs en la inducción de la producción de MMP13 había sido descrita previamente en células de osteosarcoma en respuesta a la activación de la vía de Wnt5a/Ror2 (Enomoto *et al.*, 2009).

Como la activación de los receptores de la familia ERBB/HER por NRG desencadena respuestas biológicas asociadas a un fenotipo oncogénico, incluyendo la estimulación de la proliferación celular, la migración y la diseminación local, o la promoción de la diseminación metastásica (Montero *et al.*, 2008), a continuación exploramos si el tratamiento de las células con dasatinib afectaba a algunas de estas respuestas en nuestro modelo de estudio. En este trabajo mostramos por primera vez que dasatinib reduce la proliferación, la migración y la invasión celular desencadenadas por NRG en las células de cáncer de mama. De todos estos procesos, nuestro grupo había descrito previamente que la migración y la invasión inducidas tras la estimulación con NRG, pero no la proliferación celular, estaban reguladas por la producción de MMP13 (Seoane *et al.*, 2016). Después de identificar a SRC y a YES como intermediarios en el control de la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG, y de observar que dasatinib inhibía estos procesos,

investigamos si el silenciamiento de *SRC* o de *YES1* tenía las mismas propiedades antimetastásicas que el fármaco. Los ensayos de migración celular llevados a cabo revelaron que el silenciamiento de *SRC* reducía la migración de las células MCF7 en condiciones basales y en respuesta a la estimulación con NRG. Del mismo modo, el silenciamiento de *YES1* también redujo la migración de las células MCF7 en condiciones basales y después de la estimulación con NRG. De manera análoga a lo observado en los ensayos de migración, los experimentos de invasión celular realizados mostraron que el silenciamiento de *SRC* disminuía la invasión de las células MCF7 en condiciones basales y en respuesta a la estimulación con NRG. Asimismo, el silenciamiento de *YES1* también redujo la invasión de las células MCF7 en condiciones basales y tras la estimulación con NRG. Estos resultados confirmaron que el silenciamiento génico de *SRC* o de *YES1* tenía propiedades antimetastásicas y reforzaron el papel de ambas proteínas como intermediarios en los procesos mediados por la producción de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación con NRG. Es importante mencionar que, aunque en este trabajo hemos identificado a algunas SFKs como intermediarios en procesos de migración e invasión celular mediados por NRG a través de la inducción de la producción de MMP13, la implicación de las SFKs en los procesos celulares de migración e invasión está ampliamente reportada en la literatura (Thomas y Brugge, 1997; Summy y Gallick, 2003; Guarino, 2010).

Dado que los resultados obtenidos en las células MCF7 *in vitro* apuntaban a que dasatinib era un candidato atractivo para bloquear la diseminación metastásica inducida por NRG y mediada por MMP13 en cáncer de mama, realizamos experimentos *in vivo* para explorar el papel de dasatinib en este proceso. Las células MCF7 se modificaron genéticamente, de manera que expresaran NRG para inducir la producción de MMP13, y se inyectaron en ratones desnudos. Como esperábamos, además de la generación de los tumores primarios en el lugar de la inyección, algunas de las células tuvieron la capacidad de expandirse más allá del sitio de implantación del tumor primario debido a la inducción de la producción de MMP13, dando lugar a la formación de tumores secundarios (Seoane *et al.*, 2016). Sin embargo, la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama sobreexpresoras de NRG no tuvo lugar en todos los animales incluidos en el estudio, poniendo de manifiesto la importancia del papel del microambiente tumoral en el comportamiento del tumor. Los experimentos llevados a cabo nos permitieron confirmar que el tratamiento de los ratones con dasatinib bloqueaba la diseminación metastásica inducida por NRG y mediada por MMP13 de las células de cáncer de mama. Además, estos experimentos también nos permitieron observar que el tratamiento con dasatinib producía una reducción del crecimiento tumoral, que era coherente con el efecto inhibitorio ejercido por el fármaco sobre la proliferación de las células MCF7 inducida por NRG, que habíamos observado anteriormente. Asimismo, el tratamiento de los ratones con dasatinib también disminuyó la diseminación local de los tumores generados. Como la diseminación local de las células tumorales se produce como consecuencia del proceso de invasión, estos resultados también estarían apoyados por

los obtenidos previamente en las células MCF7, en las cuales el tratamiento con el inhibidor disminuyó la invasión celular desencadenada por la estimulación con NRG y mediada por MMP13.

En este trabajo hemos mostrado por primera vez que el TKI dasatinib bloquea la diseminación metastásica promovida por NRG y mediada por MMP13 en un modelo preclínico de cáncer de mama. El hecho de que algunos autores hayan descrito la expresión de NRG en los tumores de hasta un 50 % de las pacientes con cáncer de mama (de Alava *et al.*, 2007) estaría indicando que un porcentaje de pacientes podría beneficiarse de este tratamiento. Asimismo, el hecho de que dasatinib esté aprobado para su uso en la práctica clínica para el tratamiento de otros tipos de cáncer facilita la incorporación de este fármaco para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama con expresión de NRG. En los últimos años se han realizado o comenzado varios ensayos clínicos con dasatinib como único agente o en combinación con otros fármacos en cáncer de mama (Montero *et al.*, 2011a; Scher y Somlo, 2013). Los estudios que han evaluado la eficacia de dasatinib como único agente han mostrado una actividad limitada (Finn *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2011), que se ha visto mejorada con la combinación con otros fármacos como paclitaxel (Fornier *et al.*, 2011), ixabepilona (Schwartzberg *et al.*, 2011), capecitabina (Somlo *et al.*, 2013) y con diferentes terapias hormonales (Llombart *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado ningún subgrupo de pacientes que responda preferentemente al tratamiento con dasatinib, por lo que son necesarios estudios adicionales que permitan la identificación de algún marcador molecular de sensibilidad al tratamiento con dasatinib (Scher y Somlo, 2013). En este sentido, nuestros resultados estarían apoyando la selección de las pacientes en función de la expresión de NRG en los tumores de mama, como posible marcador molecular de sensibilidad a dasatinib. Además, como la expresión de NRG también se ha descrito en otros tipos de cáncer, entre los que se encuentran de próstata (Leung *et al.*, 1997; Lyne *et al.*, 1997; Hayes *et al.*, 2007), de colon (Venkateswarlu *et al.*, 2002; Eschrich *et al.*, 2005), de ovario (Gilmour *et al.*, 2002), de endometrio (Srinivasan *et al.*, 1999), papilar tiroideo (Fluge *et al.*, 2000) o pancreático (Kolb *et al.*, 2007), la relevancia clínica de los resultados obtenidos en este trabajo podría ser mayor de demostrarse que la diseminación metastásica promovida por NRG y mediada por MMP13 tiene lugar en algún otro tipo de cáncer.

## **VI. CONCLUSIONES**

---



---

## CAPÍTULO 1

1. Dasatinib inhibe la producción de MMP13 inducida en respuesta a la estimulación con NRG *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama. La inhibición de la producción de MMP13 tras la estimulación con NRG tiene lugar a nivel transcripcional, aparentemente a través de la inhibición de la vía de ERK1/2.
2. Las tirosina quinasas SRC, YES y CSK son intermediarios de señalización en la producción de MMP13 en respuesta a la estimulación con NRG.
3. Dasatinib disminuye la proliferación, migración e invasión celular desencadenadas en respuesta a la estimulación con NRG *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama.
4. Dasatinib reduce la proliferación y la diseminación local de las células MCF7 sobreexpresoras de la isoforma  $\alpha 2c$  de la NRG1 de rata *in vivo*. Asimismo, dasatinib bloquea la diseminación metastásica de estas células promovida por NRG y mediada por MMP13.





## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Adams, J., Palombella, V. J., Sausville, E. A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D. D., Maas, J., Pien, C. S., Prakash, S. y Elliott, P. J. 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res*, 59(11): 2615-22.
- Agus, D. B., Akita, R. W., Fox, W. D., Lewis, G. D., Higgins, B., Pisacane, P. I., Lofgren, J. A., Tindell, C., Evans, D. P., Maiese, K., Scher, H. I. y Sliwkowski, M. X. 2002. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell*, 2(2): 127-37.
- Amiri-Kordestani, L., Blumenthal, G. M., Xu, Q. C., Zhang, L., Tang, S. W., Ha, L., Weinberg, W. C., Chi, B., Candau-Chacon, R., Hughes, P., Russell, A. M., Miksinski, S. P., Chen, X. H., McGuinn, W. D., Palmby, T., Schrieber, S. J., Liu, Q., Wang, J., Song, P., Mehrotra, N., Skarupa, L., Clouse, K., Al-Hakim, A., Sridhara, R., Ibrahim, A., Justice, R., Pazdur, R. y Cortazar, P. 2014. FDA approval: ado-trastuzumab emtansine for the treatment of patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 20(17): 4436-41.
- An, J., Sun, Y., Fisher, M. y Rettig, M. B. 2004. Maximal apoptosis of renal cell carcinoma by the proteasome inhibitor bortezomib is nuclear factor-kappaB dependent. *Mol Cancer Ther*, 3(6): 727-36.
- Anderson, N. G. y Ahmad, T. 2002. ErbB receptor tyrosine kinase inhibitors as therapeutic agents. *Front Biosci*, 7: d1926-40.
- Andre, F., Campone, M., O'Regan, R., Manlius, C., Massacesi, C., Sahmoud, T., Mukhopadhyay, P., Soria, J. C., Naughton, M. y Hurvitz, S. A. 2010. Phase I study of everolimus plus weekly paclitaxel and trastuzumab in patients with metastatic breast cancer pretreated with trastuzumab. *J Clin Oncol*, 28(34): 5110-5.
- Arnould, L., Gelly, M., Penault-Llorca, F., Benoit, L., Bonnetain, F., Migeon, C., Cabaret, V., Fermeaux, V., Bertheau, P., Garnier, J., Jeannin, J. F. y Coudert, B. 2006. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer*, 94(2): 259-67.
- Arteaga C. L. y Engelman J. A. 2014. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 25(3): 282-303.
- Arteaga, C. L., Sliwkowski, M. X., Osborne, C. K., Perez, E. A., Puglisi, F. y Gianni, L. 2011. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol*, 9(1): 16-32.
- Awada, A., Albanell, J., Canney, P. A., Dirix, L. Y., Gil, T., Cardoso, F., Gascon, P., Piccart, M. J. y Baselga, J. 2008. Bortezomib/docetaxel combination therapy in patients with anthracycline-pretreated advanced/metastatic breast cancer: a phase I/II dose-escalation study. *Br J Cancer*, 98(9): 1500-7.
- Bao, X., Ren, T., Huang, Y., Ren, C., Yang, K., Zhang, H. y Guo, W. 2017. Bortezomib induces apoptosis and suppresses cell growth and metastasis by inactivation of Stat3 signaling in chondrosarcoma. *Int J Oncol*, 50(2): 477-86.
- Barbacci, E. G., Guarino, B. C., Stroh, J. G., Singleton, D. H., Rosnack, K. J., Moyer, J. D. y Andrews, G. C. 1995. The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding. *J Biol Chem*, 270(16): 9585-9.
- Baselga, J., Gelmon, K. A., Verma, S., Wardley, A., Conte, P., Miles, D., Bianchi, G., Cortes, J., McNally, V. A., Ross, G. A., Fumoleau, P. y Gianni, L. 2010. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*, 28(7): 1138-44.
- Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M. y Mendelsohn, J. 1998. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res*, 58(13): 2825-31.
- Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, I. C. y Norton, L. 1996. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 14(3): 737-44.
- Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. y Corvaia, N. 2017. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov*, 16(5):315-37.
- Belsches-Jablonski, A. P., Biscardi, J. S., Peavy, D. R., Tice, D. A., Romney, D. A. y Parsons, S. J. 2001. Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene*, 20(12): 1465-75.
- Berkers, C. R., Verdoes, M., Lichtman, E., Fiebiger, E., Kessler, B. M., Anderson, K. C., Ploegh, H. L., Ovaa, H. y Galardy, P. J. 2005. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat Methods*, 2(5): 357-62.

- Berns, K., Horlings, H. M., Hennessy, B. T., Madiredjo, M., Hijmans, E. M., Beelen, K., Linn, S. C., Gonzalez-Angulo, A. M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., Beijersbergen, R. L., Mills, G. B., van de Vijver, M. J. y Bernards, R. 2007. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 12(4): 395-402.
- Bianchi, G., Oliva, L., Cascio, P., Pengo, N., Fontana, F., Cerruti, F., Orsi, A., Pasqualetto, E., Mezghrani, A., Calbi, V., Palladini, G., Giuliani, N., Anderson, K. C., Sitia, R. y Cenci, S. 2009. The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood*, 113(13): 3040-9.
- Bjornsti, M. A. y Houghton, P. J. 2004. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4(5): 335-48.
- Blackwell, K. L., Burstein, H. J., Storniolo, A. M., Rugo, H., Sledge, G., Koehler, M., Ellis, C., Casey, M., Vukelja, S., Bischoff, J., Baselga, J. y O'Shaughnessy, J. 2010. Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 28(7): 1124-30.
- Blobel, C. P. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1): 32-43.
- Borrell-Pagès, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J. y Arribas, J. 2003. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- $\alpha$  in tumors. *EMBO J*, 22 (5): 1114-24.
- Bosch, A., Eroles, P., Zaragoza, R., Viña, J. R. y Lluch, A. 2010. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev*, 36(3): 206-15.
- Breuleux, M. 2007. Role of heregulin in human cancer. *Cell Mol Life Sci*, 64(18): 2358-77.
- Browne, B. C., Crown, J., Venkatesan, N., Duffy, M. J., Clynes, M., Slamon, D. y O'Donovan, N. 2011. Inhibition of IGF1R activity enhances response to trastuzumab in HER-2-positive breast cancer cells. *Ann Oncol*, 22(1): 68-73.
- Bruce, J., Carter, D. C. y Fraser, J. 1970. Patterns of recurrent disease in breast cancer. *Lancet*, 1(7644): 433-5.
- Buday, L. y Downward, J. 1993. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*, 73(3): 611-20.
- Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W. y Yokoyama, S. 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*, 12(3): 541-52.
- Burstein, H. J., Sun, Y., Dirix, L. Y., Jiang, Z., Paridaens, R., Tan, A. R., Awada, A., Ranade, A., Jiao, S., Schwartz, G., Abbas, R., Powell, C., Turnbull, K., Vermette, J., Zacharchuk, C. y Badwe, R. 2010. Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 28(8): 1301-7.
- Cai, Z., Zhang, H., Liu, J., Berezov, A., Murali, R., Wang, Q. y Greene, M. I. 2010. Targeting erbB receptors. *Semin Cell Dev Biol*, 21(9): 961-6.
- Cardoso, F., Durbecq, V., Laes, J. F., Badran, B., Lagneaux, L., Bex, F., Desmedt, C., Willard-Gallo, K., Ross, J. S., Burny, A., Piccart, M. y Sotiriou, C. 2006. Bortezomib (PS-341, Velcade) increases the efficacy of trastuzumab (Herceptin) in HER-2-positive breast cancer cells in a synergistic manner. *Mol Cancer Ther*, 5(12): 3042-51.
- Cardoso, F., Ross, J. S., Piccart, M. J., Sotiriou, C. y Durbecq, V. 2004. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 5(2): 148-57.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E. y Shepard, H. M. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10): 4285-9.
- Carvalho, S., Levi-Schaffer, F., Sela, M. y Yarden, Y. 2016. Immunotherapy of cancer: from monoclonal to oligoclonal cocktails of anti-cancer antibodies: IUPHAR Review 18. *Br J Pharmacol*, 173(9): 1407-24.
- Cavallaro, U. y Christofori, G. 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(2): 118-32.
- Chatterji, T., Varkaris, A. S., Parikh, N. U., Song, J. H., Cheng, C. J., Schweppe, R. E., Alexander, S., Davis, J. W., Troncoso, P., Friedl, P., Kuang, J., Lin, S. H. y Gallick, G. E. 2015. Yes-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 increases metastatic potential of prostate cancer cells. *Oncotarget*, 6(12): 10175-94.

- Chauhan D., Li G., Shringarpure R., Podar K., Ohtake Y., Hideshima T. y Anderson K. C. 2003. Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res*, 63(19): 6174-7.
- Chauhan, D., Tian, Z., Nicholson, B., Kumar, K. G., Zhou, B., Carrasco, R., McDermott, J. L., Leach C. A., Fulciniti, M., Kodrasov, M. P., Weinstock, J., Kingsbury, W. D., Hideshima, T., Shah, P. K., Minvielle, S., Altun, M., Kessler, B. M., Orlowski, R., Richardson, P., Munshi, N. y Anderson, K. C. 2012. A small molecule inhibitor of ubiquitin-specific protease-7 induces apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes bortezomib resistance. *Cancer Cell*, 22(3): 345-58.
- Chen, Z., Ricker, J. L., Malhotra, P. S., Nottingham, L., Bagain, L., Lee, T. L., Yeh, N. T. y Van Waes, C. 2008. Differential bortezomib sensitivity in head and neck cancer lines corresponds to proteasome, nuclear factor-kappaB and activator protein-1 related mechanisms. *Mol Cancer Ther*, 7(7):1949-60.
- Chen, Z. Y., Cai, L., Bie, P., Wang, S. G., Jiang, Y., Dong, J. H. y Li, X. W. 2010. Roles of Fyn in pancreatic cancer metastasis. *J Gastroenterol Hepatol*, 25(2): 293-301.
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W. y Leahy, D. J. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 421(6924): 756-60.
- Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R. y Hershko, A. 1981. Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(2): 761-5.
- Citri, A., Skaria, K. B. and Yarden, Y. 2003. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*, 284(1): 54-65.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. y Ravetch, J. V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 6(4): 443-6.
- Codony-Servat, J., Albanell, J., Lopez-Talavera, J. C., Arribas, J. y Baselga, J. 1999. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res*, 59(6): 1196-201.
- Codony-Servat, J., Tapia, M. A., Bosch, M., Oliva, C., Domingo-Domenech, J., Mellado, B., Rolfe, M., Ross, J. S., Gascon, P., Rovira, A. y Albanell, J. 2006. Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 5(3): 665-75.
- Connolly, D. T. 1991. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem*, 47(3): 219-23.
- Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y. C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P. H., Libermann, T. A., Schlessinger, J. y Francke, U. 1985. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230(4730): 1132-9.
- Cuello, M., Ettenberg, S. A., Clark, A. S., Keane, M. M., Posner, R. H., Nau, M. M., Dennis, P. A. y Lipkowitz, S. 2001. Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res*, 61(12): 4892-900.
- Dai, Y., Rahmani, M. y Grant, S. 2003. Proteasome inhibitors potentiate leukemic cell apoptosis induced by the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol through a SAPK/JNK- and NF-kappaB-dependent process. *Oncogene*, 22(46): 7108-22.
- Danø, K., Behrendt, N., Høyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund, L. R., Ploug, M. y Rømer, J. 2005. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost*, 93(4): 676-81.
- Davis, H. E., Morgan, J. R. y Yarmush, M. L. 2002. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem*, 97(2-3): 159-72.
- de Alava, E., Ocaña, A., Abad, M., Montero, J. C., Esparís-Ogando, A., Rodríguez, C. A., Otero, A. P., Hernández, T., Cruz, J. J. y Pandiella, A. 2007. Neuregulin expression modulates clinical response to trastuzumab in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 25(19): 2656-63.
- de Castro Junior, G., Puglisi, F., de Azambuja, E., El Saghir, N. S. y Awada, A. 2006. Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the "do ut des" paradigm). *Crit Rev Oncol Hematol*, 59(1): 40-50.
- De Laurentiis, M., Cianniello, D., Caputo, R., Stanzione, B., Arpino, G., Cinieri, S., Lorusso, V. y De Placido, S. 2010. Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treat Rev*, 36 Suppl 3: S80-6.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. y Rechsteiner, M. 1994. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*, 269(10): 7059-61.

- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D. M., Morgan, M. B., Fulton, L., Fulton, R. S., Zhang, Q., Wendl, M. C., Lawrence, M. S., Larson, D. E., Chen, K., Dooling, D. J., Sabo, A., Hawes, A. C., Shen, H., Jhangiani, S. N., Lewis, L. R., Hall, O., Zhu, Y., Mathew, T., Ren, Y., Yao, J., Scherer, S. E., Clerc, K., Metcalf, G. A., Ng, B., Milosavljevic, A., Gonzalez-Garay, M. L., Osborne, J. R., Meyer, R., Shi, X., Tang, Y., Koboldt, D. C., Lin, L., Abbott, R., Miner, T. L., Pohl, C., Fewell, G., Haippek, C., Schmidt, H., Dunford-Shore, B. H., Kraja, A., Crosby, S. D., Sawyer, C. S., Vickery, T., Sander, S., Robinson, J., Winckler, W., Baldwin, J., Chirieac, L. R., Dutt, A., Fennell, T., Hanna, M., Johnson, B. E., Onofrio, R. C., Thomas, R. K., Tonon, G., Weir, B. A., Zhao, X., Ziaugra, L., Zody, M. C., Giordano, T., Orringer, M. B., Roth, J. A., Spitz, M. R., Wistuba, I. I., Ozenberger, B., Good, P. J., Chang, A. C., Beer, D. G., Watson, M. A., Ladanyi, M., Broderick, S., Yoshizawa, A., Travis, W. D., Pao, W., Province, M. A., Weinstock, G. M., Varmus, H. E., Gabriel, S. B., Lander, E. S., Gibbs, R. A., Meyerson, M. y Wilson, R. K. 2008. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 455(7216): 1069-75.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. y Waterfield, M. D. 1984. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307(5951): 521-7.
- Drebin, J. A., Link, V. C., Stern, D. F., Weinberg R.A. y Greene, M. I. 1985. Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell*, 41(3): 697-706.
- du Manoir, J. M., Francia, G., Man, S., Mossoba, M., Medin, J. A., Viloria-Petit, A., Hicklin, D. J., Emmenegger, U. y Kerbel, R. S. 2006. Strategies for delaying or treating in vivo acquired resistance to trastuzumab in human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res*, 12(3 Pt 1): 904-16.
- Duan, J., Friedman, J., Nottingham, L., Chen, Z., Ara, G. y Van, Waes C. 2007. Nuclear factor-kappaB p65 small interfering RNA or proteasome inhibitor bortezomib sensitizes head and neck squamous cell carcinomas to classic histone deacetylase inhibitors and novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Mol Cancer Ther*, 6(1): 37-50.
- Dvorak, H. F. 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*, 20(21): 4368-80.
- Eccles, S. A. 2011. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol*, 55(7-9): 685-96.
- Egan, S. E., Giddings, B. W., Brooks, M. W., Buday, L., Sizeland, A. M. y Weinberg, R. A. 1993. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, 363(6424): 45-51.
- Egeblad, M. y Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2(3): 161-74.
- Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Müller, B., Hanna, J. y Finley, D. 2004. Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem*, 279(26): 26817-22.
- Enomoto M., Hayakawa S., Itsukushima S., Ren D. Y., Matsuo M., Tamada K., Oneyama C., Okada M., Takumi T., Nishita M. y Minami Y. 2009. Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling. *Oncogene*, 28(36): 3197-208.
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A. y Lluch, A. 2012. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38(6): 698-707.
- Eschrich, S., Yang, I., Bloom, G., Kwong, K. Y., Boulware, D., Cantor, A., Coppola, D., Kruhøffer, M., Aaltonen, L., Orntoft, T. F., Quackenbush, J. y Yeatman, T. J. 2005. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*, 23(15): 3526-35.
- Esparís-Ogando, A., Díaz-Rodríguez, E., Montero, J. C., Yuste, L., Crespo, P. y Pandiella, A. 2002. Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol*, 22(1): 270-85.
- Falls, D. L. 2003. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res*, 284(1): 14-30.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feese, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A. y Trzaskos, J. M. 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, 273(29): 18623-32.
- Fendly, B. M., Winget, M., Hudziak, R. M., Lipari, M. T., Napier, M. A. y Ullrich, A. 1990. Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor

- receptor or HER2/neu gene product. *Cancer Res*, 50(5): 1550-8.
- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D. M., Forman D. y Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5): E359-86.
- Fernández, Y., Verhaegen, M., Miller, T. P., Rush, J. L., Steiner, P., Opipari, A. W., Lowe, S. W. y Soengas, M. S. 2005. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res*, 65(14): 6294-6304.
- Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. y Leung, D. W. 1992. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, 13(1): 18-32.
- Fessler, S. P., Wotkowicz, M. T., Mahanta, S. K. y Bamdad, C. 2009. MUC1\* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 118(1): 113-24.
- Fidler, I. J. 1970. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*, 45(4): 773-82.
- Finley, D. 2009. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*, 78: 477-513.
- Finn, R. S., Bengala, C., Ibrahim, N., Roché, H., Sparano, J., Strauss, L. C., Fairchild, J., Sy, O. y Goldstein, L. J. 2011. Dasatinib as a single agent in triple-negative breast cancer: results of an open-label phase 2 study. *Clin Cancer Res*, 17(21): 6905-13.
- Finn, R. S., Dering J., Ginther, C., Wilson, C. A., Glaspy, P., Tchekmedyan, N. y Slamon D. J. 2007. Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro. *Breast Cancer Res Treat*, 105(3): 319-26.
- Fluge, O., Akslen, L. A., Haugen, D. R., Varhaug, J. E. y Lillehaug, J. R. 2000. Expression of heregulins and associations with the ErbB family of tyrosine kinase receptors in papillary thyroid carcinomas. *Int J Cancer*, 87(6): 763-70.
- Fornier, M. N., Morris, P. G., Abbuzzi, A., D'Andrea, G., Gilewski, T., Bromberg, J., Dang, C., Dickler, M., Modi, S., Seidman, A. D., Sklarin, N., Chang, J., Norton, L. y Hudis, C. A. 2011. A phase I study of dasatinib and weekly paclitaxel for metastatic breast cancer. *Ann Oncol*, 22(12): 2575-81.
- Frederick, L., Wang, X. Y., Eley, G. y James, C. D. 2000. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res*, 60(5): 1383-7.
- Friedl, P. y Wolf, K. 2008. Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res*, 68(18): 7247-9.
- Frisch, S. M. y Francis, H. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124(4): 619-26.
- Frisch, S. M., Vuori, K., Ruoslahti, E. y Chan-Hui, P. Y. 1996. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, 134(3): 793-9.
- Fry, D. W. 2003. Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Exp Cell Res*, 284(1):131-9.
- Garcia-Saenz, J. A., Bermejo, B., Estevez, L. G., Palomo, A. G., Gonzalez-Farre, X., Margeli, M., Pernas, S., Servitja, S., Rodriguez, C. A. y Ciruelos, E. 2015. SEOM clinical guidelines in early-stage breast cancer 2015. *Clin Transl Oncol*, 17(12): 939-45.
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W. y Ward, C. W. 2003. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell*, 11(2): 495-505.
- Gavilá, J., Lopez-Tarruella, S., Saura, C., Muñoz, M., Oliveira, M., De la Cruz-Merino, L., Morales, S., Alvarez, I., Virizuela, J. A. y Martin, M. 2015. SEOM clinical guidelines in metastatic breast cancer 2015. *Clin Transl Oncol*, 17(12): 946-55.
- Gennari, R., Menard, S., Fagnoni, F., Ponchio, L., Scelsi, M., Tagliabue, E., Castiglioni, F., Villani, L., Magalotti, C., Gibelli, N., Oliviero, B., Ballardini, B., Da Prada, G., Zambelli, A. y Costa, A. 2004. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res*, 10(17): 5650-5.
- Geyer, C. E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C. G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., Skarlos, D., Campone, M., Davidson, N., Berger, M., Oliva, C., Rubin, S. D., Stein, S. y Cameron, D. 2006. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*, 355(26): 2733-43.

- Gilmartin, A. G., Bleam, M. R., Groy, A., Moss, K. G., Minthorn, E. A., Kulkarni, S. G., Rominger, C. M., Erskine, S., Fisher, K. E., Yang, J., Zappacosta, F., Annan, R., Sutton, D. y Laquerre, S. G. 2011. GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clin Cancer Res*, 17(5): 989-1000.
- Gilmour, L. M., Macleod, K. G., McCaig, A., Sewell, J. M., Gullick, W. J., Smyth, J. F. y Langdon, S. P. 2002. Neuregulin expression, function, and signaling in human ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*, 8(12): 3933-42.
- Ginestier, C., Adélaïde, J., Gonçalves, A., Repellini, L., Sircoulomb, F., Letessier, A., Finetti, P., Geneix, J., Charafe-Jauffret, E., Bertucci, F., Jacquemier, J., Viens, P. y Birnbaum, D. 2007. ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene*, 26(50): 7163-9.
- Glickman, M. H. y Ciechanover, A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82(2): 373-428.
- Grandis, J. R., Drenning, S. D., Zeng, Q., Watkins, S. C., Melhem, M. F., Endo, S., Johnson, D. E., Huang, L., He, Y. y Kim, J. D. 2000. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8): 4227-32.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M. y Hynes, N. E. 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*, 16(7): 1647-55.
- Groll, M., Berkers, C. R., Ploegh, H. L. y Ova, H. 2006. Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure*, 14(3): 451-6.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jäger, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D. H. y Huber, R. 1999. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20): 10976-83.
- Grosicki, S., Barchnicka, A., Jurczyszyn, A. y Grosicka, A. 2014. Bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Expert Rev Hematol*, 7(2): 173-85.
- Guarino, M. 2010. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol*, 223(1): 14-26.
- Guerrouahen, B. S., Futami, M., Vaklavas, C., Kanerva, J., Whichard, Z. L., Nwawka, K., Blanchard, E. G., Lee, F. Y., Robinson, L. J., Arceci, R., Kornblau, S. M., Wiedner, E., Cayre, Y. E. y Corey, S. J. 2010. Dasatinib inhibits the growth of molecularly heterogeneous myeloid leukemias. *Clin Cancer Res*, 16(4): 1149-58.
- Guy, P. M., Platko, J. V., Cantley, L. C., Cerione, R. A. y Carraway, K. L. 1994. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(17): 8132-6.
- Götte, M. y Yip, G. W. 2006. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res*, 66(21): 10233-7.
- Hambley, B., Caimi, P. F. y William, B. M. 2016. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma: an update. *Ther Adv Hematol*, 7(4): 196-208.
- Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A. y Connelly, P. A. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem*, 271(2): 695-701.
- Harris, L. N., You, F., Schnitt, S. J., Witkiewicz, A., Lu, X., Sgroi, D., Ryan, P. D., Come, S. E., Burstein, H. J., Lesnikowski, B. A., Kamma, M., Friedman, P. N., Gelman, R., Iglehart, J. D. y Winer, E. P. 2007. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res*, 13(4): 1198-207.
- Harris, R. C., Chung, E. y Coffey, R. J. 2003. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*, 284(1): 2-13.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. y Haupt, Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, 116(Pt 20): 4077-85.
- Hayes, N. V., Blackburn, E., Smart, L. V., Boyle, M. M., Russell, G. A., Frost, T. M., Morgan, B. J., Baines, A. J. y Gullick, W. J. 2007. Identification and characterization of novel spliced variants of neuregulin 4 in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 13(11): 3147-55.
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M. G., Yin, Y., Khramtsov, A. I., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R. I., Brown, P. H., Green, J. E., Kopelovich, L., Furth, P. A., Palazzo, J. P., Olopade, O. I., Bernard, P. S., Churchill, G. A., Van Dyke, T. y Perou, C. M. 2007. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*, 8(5): R76.



- Hershko, A., Ciechanover, A. y Rose, I. A. 1981. Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J Biol Chem*, 256(4): 1525-8.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. and Ciechanover, A. 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, 258(13): 8206-14.
- Hershko, A., Heller, H., Eytan, E. y Reiss, Y. 1986. The protein substrate binding site of the ubiquitin-protein ligase system. *J Biol Chem*, 261(26): 11992-9.
- Hicklin, D. J. y Ellis, L. M. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 23(5): 1011-27.
- Hideshima, T., Podar, K., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Mitsiades, C., Tai, Y. T., Hamasaki, M., Raje, N., Hideshima, H., Schreiner, G., Nguyen, A. N., Navas, T., Munshi, N. C., Richardson, P. G., Higgins, L. S. y Anderson, K. C. 2004. p38 MAPK inhibition enhances PS-341 (bortezomib)-induced cytotoxicity against multiple myeloma cells. *Oncogene*, 23(54): 8766-76.
- Higashiyama, S., Iwabuki, H., Morimoto, C., Hieda, M., Inoue, H. y Matsushita, N. 2008. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci*, 99(2): 214-20.
- Hikita, S. T., Kosik, K. S., Clegg, D. O. y Bamdad, C. 2008. MUC1\* mediates the growth of human pluripotent stem cells', *PLoS One*, 3(10): e3312.
- Hildebrand, J. D., Schaller, M. D. y Parsons, J. T. 1993. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions', *J Cell Biol*, 123(4): 993-1005.
- Hiratsuka S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J. M., Senior, R. M. y Shibuya, M. 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*, 2(4): 289-300.
- Holmes, W. E., Sliwkowski, M. X., Akita, R. W., Henzel, W. J., Lee, J., Park, J. W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H. y Lewis, G. D. 1992. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science*, 256(5060): 1205-10.
- Huang, Z., Wu, Y., Zhou, X., Xu, J., Zhu, W., Shu, Y. y Liu, P. 2014. Efficacy of therapy with bortezomib in solid tumors: a review based on 32 clinical trials. *Future Oncol*, 10(10): 1795-807.
- Hudziak, R. M., Lewis, G. D., Winget, M., Fendly, B. M., Shepard, H. M. y Ullrich, A. 1989. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol*, 9(3): 1165-72.
- Hunter, K. W., Crawford, N. P. y Alsarraj, J. 2008. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res*, 10(Suppl 1): S2.
- Husnjak, K., Elsassser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K. J., Finley, D. y Dikic, I. 2008. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*, 453(7194): 481-8.
- Hynes N. E. y Lane H. A. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5(5): 341-54.
- Hynes N. E. y MacDonald G. 2009. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 21(2): 177-84.
- Ishizawar, R. y Parsons, S. J. 2004. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell*, 6(3): 209-14.
- Ishizawar, R. C., Miyake, T. y Parsons, S. J. 2007. c-Src modulates ErbB2 and ErbB3 heterocomplex formation and function. *Oncogene*, 26(24): 3503-10.
- Iwatsuki, M., Mimori, K., Yokobori, T., Ishi, H., Beppu, T., Nakamori, S., Baba, H. y Mori, M. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci*, 101(2): 293-9.
- Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D. y Jain, R. K. 2002. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*, 416(6878): 279-80.
- Jaiswal, B. S., Kljavin, N. M., Stawiski, E. W., Chan, E., Parikh, C., Durinck, S., Chaudhuri, S., Pujara, K., Guillory, J., Edgar, K. A., Janakiraman, V., Scholz, R. P., Bowman, K. K., Lorenzo, M., Li, H., Wu, J., Yuan, W., Peters, B. A., Kan, Z., Stinson, J., Mak, M., Modrusan, Z., Eigenbrot, C., Firestein, R., Stern, H. M., Rajalingam, K., Schaefer, G., Merchant, M. A., Sliwkowski, M. X., de Sauvage, F. J. y Seshagiri, S. 2013. Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. *Cancer Cell*, 23(5): 603-17.
- Jerusalem, G., Fasolo, A., Dieras, V., Cardoso, F., Bergh, J., Vittori, L., Zhang, Y., Massacesi, C., Sahmoud, T. y Gianni, L. 2011. Phase I trial of oral mTOR inhibitor everolimus in combination with trastuzumab and vinorelbine in pre-treated patients

- with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 125(2): 447-55.
- Johnson, F. M., Saigal, B., Talpaz, M. y Donato, N. J. 2005. Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res*, 11(19 Pt 1): 6924-32.
- Joshi, J. P., Brown, N. E., Griner, S. E. y Nahta, R. 2011. Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 82(9): 1090-9.
- Junttila, T. T., Akita, R. W., Parsons, K., Fields, C., Lewis Phillips, G. D., Friedman, L. S., Sampath, D. y Sliwkowski, M. X. 2009. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell*, 15(5): 429-40.
- Kadamur, G. y Ross E. M. 2013. Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol*, 75:127-54.
- Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cordon-Cardo, C., Guise, T. A. y Massagué, J. 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 3(6): 537-49.
- Karaman, M. W., Herrgard, S., Treiber, D. K., Gallant, P., Atteridge, C. E., Campbell, B. T., Chan, K. W., Ciceri, P., Davis, M. I., Edeen, P. T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J. P., Lockhart, D. J., Milanov, Z. V., Morrison, M. J., Pallares, G., Patel, H. K., Pritchard, S., Wodicka, L. M. y Zarrinkar, P. P. 2008. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*, 26(1): 127-32.
- Kawakami, T., Suzuki, T., Baek, S. H., Chung, C. H., Kawasaki, H., Hirano, H., Ichiyama, A., Omata, M. y Tanaka, K. 1999. Isolation and characterization of cytosolic and membrane-bound deubiquitinating enzymes from bovine brain. *J Biochem*, 126(3): 612-23.
- Keating, G. M. (2017) Dasatinib: A Review in Chronic Myeloid Leukaemia and Ph+ Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs*, 77(1): 85-96.
- Kim, H., Chan, R., Dankort, D. L., Zuo, D., Najoukas, M., Park, M. y Muller, W. J. 2005. The c-Src tyrosine kinase associates with the catalytic domain of ErbB-2: implications for ErbB-2 mediated signaling and transformation. *Oncogene*, 24(51): 7599-607.
- Kim I., Mi K. y Rao, H. 2004. Multiple interactions of rad23 suggest a mechanism for ubiquitinated substrate delivery important in proteolysis. *Mol Biol Cell*, 15(7): 3357-65.
- Kim, K. K., Lee, J. J., Yang, Y., You, K. H. y Lee, J. H. 2008. Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(4): 704-12.
- King C. R., Kraus M. H. y Aaronson S. A. 1985. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*, 229(4717): 974-6.
- Klapper, L. N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N. E., Andrews, G. C., Sela, M. y Yarden, Y. 1999. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9): 4995-5000.
- Ko, B. S., Chang, T. C. y Liou, J. Y. 2010. Focal adhesion kinase as a therapeutic target of bortezomib. *Anticancer Agents Med Chem*, 10(10): 747-52.
- Köhrmann, A., Kammerer, U., Kapp, M., Dietl, J., Anacker, J. 2009. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: new findings and review of the literature. *BMC Cancer*, 9: 188.
- Kojima, K., Konopleva, M., Samudio, I. J., Ruvolo, V. y Andreeff, M. 2007. Mitogen-activated protein kinase inhibition enhances nuclear proapoptotic function of p53 in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res*, 67(7): 3210-9.
- Kolb, A., Kleeff, J., Arnold, N., Giese, N. A., Giese, T., Korc, M. y Friess, H. 2007. Expression and differential signaling of heregulins in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer*, 120(3): 514-23.
- Kotepui, M., Punsawad, C., Chupeerach, C., Songsri, A., Charoenkijakorn, L. y Petmitr, S. 2016. Differential expression of matrix metalloproteinase-13 in association with invasion of breast cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*, 20(3): 225-8.
- Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C. y Aaronson, S. A. 1989. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23):9193-7.
- Krętowski, R., Borzym-Kluczyk, M. y Cechowska-Pasko, M. 2014. Efficient induction of apoptosis by proteasome inhibitor: bortezomib in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Mol Cell Biochem*, 389(1-2): 177-85.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-5.
- Lam, Y. A., Lawson, T. G., Velayutham, M., Zweier, J. L. y Pickart, C. M. 2002. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*, 416(6882): 763-7.
- Lambert, J. M. y Chari, R.V. Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): an antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer. 2014. *J Med Chem*, 57(16):6949-64.
- Lane, H. A., Beuvink, I., Motoyama, A. B., Daly, J. M., Neve, R. M. y Hynes, N. E. 2000. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol*, 20(9): 3210-23.
- Le, X. F., Claret, F. X., Lammayot, A., Tian, L., Deshpande, D., LaPushin, R., Tari, A. M. y Bast, R. C. 2003. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition. *J Biol Chem*, 278(26): 23441-50.
- Lee-Hoeflich, S. T., Crocker, L., Yao, E., Pham, T., Munroe, X., Hoeflich, K. P., Sliwkowski, M. X. y Stern, H. M. 2008. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res*, 68(14): 5878-87.
- Leung, H. Y., Weston, J., Gullick, W. J. y Williams, G. 1997. A potential autocrine loop between heregulin- $\alpha$  and erbB-3 receptor in human prostatic adenocarcinoma. *Br J Urol*, 79(2): 212-6.
- Levitcki, A. y Gazit, A. 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, 267(5205): 1782-8.
- Lewis Phillips, G. D., Li, G., Dugger, D. L., Crocker, L. M., Parsons, K. L., Mai, E., Blättler, W. A., Lambert, J. M., Chari, R.V., Lutz, R. J., Wong, W. L., Jacobson, F. S., Koeppen, H., Schwall, R. H., Kenkare-Mitra, S. R., Spencer, S. D. y Sliwkowski, M. X. 2008. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res*, 68(22):9280-90.
- Li, D. M. y Feng, Y. M. 2011. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. *Breast Cancer Res Treat*, 128(1): 7-21.
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B. y Schlessinger, J. 1993. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, 363(6424): 85-8.
- Li, Y., Yu, W. H., Ren, J., Chen, W., Huang, L., Kharbanda, S., Loda, M. y Kufe, D. 2003. Heregulin targets gamma-catenin to the nucleolus by a mechanism dependent on the DF3/MUC1 oncoprotein. *Mol Cancer Res*, 1(10): 765-75.
- Lima, C. F. y Rattan, S. I. 2010. Determination of proteasomal activities. *Methods Mol Biol*, 648: 183-92.
- Lindauer, M. y Hochhaus, A. 2010. Dasatinib. *Recent Results Cancer Res*, 184: 83-102.
- Linggi, B. y Carpenter, G. 2006. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol*, 16(12): 649-56.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-8.
- Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T. y Perou, C. M. 2006. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, 19(2): 264-71.
- Llombart, A., Ravaoli, A., Strauss, L., Sy, O., Abrahao, F., Geese, W. J., Lortholary, A., Rea, D., Ro J. S., Sohn, J., Kim, S. B. y Curigliano, G. Randomized Phase II Study of Dasatinib vs Placebo in Addition to Exemestane in Advanced PR/ER-Positive Breast Cancer [BMS CA180-261 Study]. Presentado en el 34th Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, 2011.
- Lombardo, L. J., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., Barrish, J. C., Behnia K., Castaneda, S., Cornelius, L. A., Das, J., Dowsyko, A. M., Fairchild, C., Hunt, J. T., Inigo, I., Johnston, K., Kamath A., Kan D., Klei, H., Marathe, P., Pang, S., Peterson, R., Pitt, S., Schieven, G. L., Schmidt, R. J., Tokarski, J., Wen, M. L., Wityak, J. y Borzilleri, R. M. 2004. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*, 47(27): 6658-61.
- Lorch, J. H., Thomas, T. O. y Schmoll, H. J. 2007. Bortezomib inhibits cell-cell adhesion and cell migration and enhances epidermal growth factor receptor inhibitor-induced cell death in squamous cell cancer. *Cancer Res*, 67(2): 727-34.

- Lu, Y., Zi, X. y Pollak, M. 2004. Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells. *Int J Cancer*, 108(3): 334-41.
- Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., Mascarenhas, D. y Pollak, M. 2001. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst*, 93(24): 1852-7.
- Lun, M., Zhang, P. L., Siegelmann-Danieli, N., Blasick, T. M. y Brown, R. E. 2005. Intracellular inhibitory effects of Velcade correlate with morphoproteomic expression of phosphorylated-nuclear factor-kappaB and p53 in breast cancer cell lines. *Ann Clin Lab Sci*, 35(1): 15-24.
- Luttrell, D. K., Lee, A., Lansing, T. J., Crosby, R. M., Jung, K. D., Willard, D., Luther, M., Rodriguez, M., Berman, J. y Gilmer, T. M. 1994. Involvement of pp60c-src with two major signaling pathways in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(1): 83-7.
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J. y Haber, D. A. 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 350(21): 2129-39.
- Lyne, J. C., Melhem, M. F., Finley, G. G., Wen, D., Liu, N., Deng, D. H. y Salup, R. 1997. Tissue expression of neu differentiation factor/hereregulin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells in vitro. *Cancer J Sci Am*, 3(1): 21-30.
- Mahanta, S., Fessler, S. P., Park, J. y Bamdad, C. 2008. A minimal fragment of MUC1 mediates growth of cancer cells. *PLoS One*, 3(4): e2054.
- Massagué, J. y Pandiella, A. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem*, 62: 515-41.
- Mayer, E. L., Baurain, J. F., Sparano, J., Strauss, L., Campone, M., Fumoleau, P., Rugo, H., Awada, A., Sy, O. y Llombart-Cussac, A. 2011. A phase 2 trial of dasatinib in patients with advanced HER2-positive and/or hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*, 17(21): 6897-904.
- Maynadier, M., Shi, J., Vaillant, O., Gary-Bobo, M., Basile, I., Gleizes, M., Cathiard, A. M., Wah, J. L., Sheikh, M. S. y Garcia, M. 2012. Roles of estrogen receptor and p21(Waf1) in bortezomib-induced growth inhibition in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res*, 10(11): 1473-81.
- McSherry, E. A., Donatello, S., Hopkins, A. M. y McDonnell, S. 2007. Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cell Mol Life Sci*, 64(24): 3201-18.
- Mego, M., Mani, S. A. y Cristofanilli, M. 2010. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol*, 7(12): 693-701.
- Memon, A. A., Sorensen, B. S., Melgard, P., Fokdal, L., Thykjaer, T. y Nexø, E. 2004. Expression of HER3, HER4 and their ligand heregulin-4 is associated with better survival in bladder cancer patients. *Br J Cancer*, 91(12): 2034-41.
- Merico, D., Isserlin, R., Stueker, O., Emili, A. y Bader, G. D. 2010. Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS One*, 5(11): e13984.
- Meyer, H., Bug, M. y Bremer, S. 2012. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol*, 14(2): 117-23.
- Mierke, C. T., Rösel, D., Fabry, B. y Brábek, J. 2008. Contractile forces in tumor cell migration. *Eur J Cell Biol*, 87(8-9): 669-76.
- Minderman, H., Zhou, Y., O'Loughlin, K. L. y Baer, M. R. 2007. Bortezomib activity and in vitro interactions with anthracyclines and cytarabine in acute myeloid leukemia cells are independent of multidrug resistance mechanisms and p53 status. *Cancer Chemother Pharmacol*, 60(2): 245-55.
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L. y Massagué, J. 2005a. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436(7050): 518-24.
- Minn, A. J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G. P., Giri, D. D., Doubrovin, M., Ponomarev, V., Gerald, W. L., Blasberg, R. y Massagué, J. 2005b. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest*, 115(1): 44-55.
- Mitchell, K., Svenson, K. B., Longmate, W. M., Gkirtzimanaki, K., Sadej, R., Wang, X., Zhao, J., Eliopoulos, A. G., Berditchevski, F. y Dipersio, C. M. 2010. Suppression of integrin alpha3beta1 in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells. *Cancer Res*, 70(15): 6359-67.
- Moffat, J., Grueneberg, D. A., Yang, X., Kim, S. Y., Kloepper, A. M., Hinkle, G., Piquani, B., Eisenhaure, T. M., Luo, B., Grenier, J. K., Carpenter, A. E., Foo, S. Y., Stewart, S. A., Stockwell, B. R., Hacohen, N., Hahn, W. C., Lander, E. S., Sabatini, D. M. y Root, D. E. 2013. A cell cycle-independent mechanism for tumorigenesis by Myc. *Nat Cell Biol*, 15(1): 103-12.

- D. E. 2006. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell*, 124(6): 1283-98.
- Montero, J. C., Rodríguez-Barrueco, R., Ocaña, A., Díaz-Rodríguez, E., Esparís-Ogando, A. y Pandiella, A. 2008. Neuregulins and cancer. *Clin Cancer Res*, 14(11): 3237-41.
- Montero, J. C., Seoane, S., Ocaña, A. y Pandiella, A. 2011a. Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clin Cancer Res*, 17(17): 5546-52.
- Montero, J. C., Seoane, S., Ocaña, A. y Pandiella, A. 2011b. P-Rex1 participates in Neuregulin-ErbB signal transduction and its expression correlates with patient outcome in breast cancer. *Oncogene*, 30(9): 1059-71.
- Montero, J. C., Yuste, L., Díaz-Rodríguez, E., Esparís-Ogando, A. y Pandiella, A. 2000. Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme. *Mol Cell Neurosci*, 16(5): 631-48.
- Montero, J. C., Yuste, L., Díaz-Rodríguez, E., Esparís-Ogando, A. y Pandiella, A. 2002. Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent routes control shedding of transmembrane growth factors through multiple secretases. *Biochem J*, 363 (Pt 2): 211-21.
- Morrow, P. K., Wulf, G. M., Ensor, J., Booser, D. J., Moore, J. A., Flores, P. R., Xiong, Y., Zhang, S., Krop, I. E., Winer, E. P., Kindelberger, D. W., Coviello, J., Sahin, A. A., Nuñez, R., Hortobagyi, G. N., Yu, D. y Esteva, F. J. 2011. Phase I/II study of trastuzumab in combination with everolimus (RAD001) in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer who progressed on trastuzumab-based therapy. *J Clin Oncol*, 29(23): 3126-32.
- Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L. y Wong, A. J. 1995. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res*, 55(23): 5536-9.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2): 55-63.
- Motoyama, A. B., Hynes, N. E. y Lane, H. A. 2002. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res*, 62(11): 3151-8.
- Moulder S. L., Yakes F. M., Muthuswamy S. K., Bianco R., Simpson J. F. y Arteaga C. L. 2001. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 61(24): 8887-95.
- Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T. M. y Ardizzoni, A. 2008. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 26(11): 1789-96.
- Muthuswamy, S. K., Siegel, P. M., Dankort, D. L., Webster, M. A. y Muller, W. J. 1994. Mammary tumors expressing the neu proto-oncogene possess elevated c-Src tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol*, 14(1): 735-43.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verástegui, E. y Zlotnik, A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824): 50-6.
- Nada, S., Okada, M., MacAule, A., Cooper, J. A. y Nakagawa, H. 1991. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature*, 351(6321): 69-72.
- Nagaraj, N. S., Smith, J. J., Revetta, F., Washington, M. K. y Merchant, N. B. 2010. Targeted inhibition of SRC kinase signaling attenuates pancreatic tumorigenesis. *Mol Cancer Ther*, 9(8): 2322-32.
- Nagata, Y., Lan, K. H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F. J., Sahin, A. A., Klos, K. S., Li, P., Monia, B. P., Nguyen, N. T., Hortobagyi, G. N., Hung, M. C. y Yu, D. 2004. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 6(2): 117-27.
- Nagy, P., Friedländer, E., Tanner, M., Kapanen, A. I., Carraway, K. L., Isola, J. y Jovin, T. M. 2005. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res*, 65(2): 473-82.
- Nahta, R. 2012. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol*, 2012: 428062.

- Nahta, R., Takahashi, T., Ueno, N. T., Hung, M. C. y Esteva, F. J. 2004. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res*, 64(11): 3981-6.
- Nahta, R., Yuan, L. X., Du, Y. y Esteva, F. J. 2007. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol Cancer Ther*, 6(2): 667-74.
- Nahta, R., Yuan, L. X., Zhang, B., Kobayashi, R. y Esteva, F. J. 2005. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res*, 65(23): 11118-28.
- Nakagawa, T., Tanaka, S., Suzuki, H., Takayanagi, H., Miyazaki, T., Nakamura, K. y Tsuruo, T. 2000. Overexpression of the csk gene suppresses tumor metastasis in vivo. *Int J Cancer*, 88(3): 384-91.
- Nautiyal, J., Majumder, P., Patel, B. B., Lee, F. Y. y Majumdar, A. P. 2009. Src inhibitor dasatinib inhibits growth of breast cancer cells by modulating EGFR signaling. *Cancer Lett*, 283(2): 143-51.
- Navas, T. A., Nguyen, A. N., Hideshima, T., Reddy, M., Ma, J. Y., Haghnazari, E., Henson, M., Stebbins, E. G., Kerr, I., O'Young, G., Kapoun, A. M., Chakravarty, S., Mavunkel, B., Perumattam, J., Luedtke, G., Dugar, S., Medicherla, S., Protter, A. A., Schreiner, G. F., Anderson, K. C. y Higgins, L. S. 2006. Inhibition of p38alpha MAPK enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis of myeloma cells by modulating Hsp27, Bcl-X(L), Mcl-1 and p53 levels in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Leukemia*, 20(6): 1017-27.
- Nawrocki, S. T., Bruns, C. J., Harbison, M. T., Bold, R. J., Gotsch, B. S., Abbruzzese, J. L., Elliott, P., Adams, J. y McConkey, D. J. 2002. Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on apoptosis and angiogenesis in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*, 1(14): 1243-53.
- Normanno, N., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., De Luca, A., Caponigro, F. y Salomon, D. S. 2005. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr Drug Targets*, 6(3): 243-57.
- Nussbaum, A. K., Dick, T. P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanović, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D. H., Huber, R., Rammensee, H. G. y Schild, H. 1998. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21): 12504-9.
- O'Brien, N. A., Browne, B. C., Chow, L., Wang, Y., Ginther, C., Arboleda, J., Duffy, M. J., Crown, J., O'Donovan, N. y Slamon, D. J. 2010. Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to trastuzumab but not lapatinib. *Mol Cancer Ther*, 9(6): 1489-502.
- Ocana, A., Vera-Badillo, F., Seruga, B., Templeton, A., Pandiella, A. y Amir, E. 2013. HER3 overexpression and survival in solid tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 105(4): 266-73.
- Okada, M., Nada, S., Yamanashi, Y., Yamamoto, T. y Nakagawa, H. 1991. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J Biol Chem*, 266(36): 24249-52.
- Okamoto, W., Okamoto, I., Yoshida, T., Okamoto, K., Takezawa, K., Hatashita, E., Yamada, Y., Kuwata, K., Arao, T., Yanagihara, K., Fukuoka, M., Nishio, K. y Nakagawa, K. 2010. Identification of c-Src as a potential therapeutic target for gastric cancer and of MET activation as a cause of resistance to c-Src inhibition. *Mol Cancer Ther*, 9(5): 1188-97.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. y Hynes, N. E. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 19(13): 3159-67.
- Oliveras-Ferraros, C., Vazquez-Martin, A., Cufí, S., Torres-Garcia, V. Z., Sauri-Nadal, T., Barco, S. D., Lopez-Bonet, E., Brunet, J., Martin-Castillo, B. y Menendez, J. A. 2011. Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/2-targeted therapies. *Biochem Biophys Res Commun*, 407(2): 412-9.
- Oliveras-Ferraros, C., Vazquez-Martin, A., Martin-Castilló, B., Pérez-Martínez, M. C., Cufí, S., Del Barco, S., Bernado, L., Brunet, J., López-Bonet, E. y Menendez, J. A. 2010. Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Int J Oncol*, 37(3): 669-78.
- Orlowski, M. y Michaud, C. 1989. Pituitary multicatalytic proteinase complex. Specificity of components and aspects of proteolytic activity. *Biochemistry*, 28(24): 9270-8.
- Orlowski, R. Z. y Dees, E. C. 2003. The role of the ubiquitination-proteasome pathway in breast cancer: applying drugs that affect the ubiquitin-proteasome pathway to the therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 5(1): 1-7.
- Paez, J. G., Jänne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F. J., Lindeman, N., Boggon, T. J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M. J., Sellers, W. R., Johnson, B. E. y Meyerson, M. 2004. EGFR mutations in lung

- cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304(5676): 1497-500.
- Pályi-Krekk, Z., Barok, M., Isola, J., Tammi, M., Szöllosi, J. y Nagy, P. 2007. Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer*, 43(16): 2423-33.
- Pandit, B. y Gartel, A. L. 2011. Proteasome inhibitors induce p53-independent apoptosis in human cancer cells. *Am J Pathol*, 178(1): 355-60.
- Panková, K., Rösel, D., Novotný, M. y Brábek, J. 2010. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci*, 67(1): 63-71.
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., Mardis, E., Kupfer, D., Wilson, R., Kris, M. y Varmus, H. 2004. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(36): 13306-11.
- Papetti, M. y Herman, I. M. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(5): C947-70.
- Park, S. I., Zhang, J., Phillips, K. A., Araujo, J. C., Najjar, A. M., Volgin, A. Y., Gelovani, J. G., Kim, S. J., Wang, Z. y Gallick, G. E. 2008. Targeting SRC family kinases inhibits growth and lymph node metastases of prostate cancer in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res*, 68(9): 3323-33.
- Park, Y. J., Lee, H. y Lee, J. H. 2010. Macrophage inhibitory cytokine-1 transactivates ErbB family receptors via the activation of Src in SK-BR-3 human breast cancer cells. *BMB Rep*, 43(2): 91-6.
- Pegram, M. D., Lipton, A., Hayes, D. F., Weber, B. L., Baselga, J. M., Tripathy, D., Baly, D., Baughman, S. A., Twaddell, T., Glaspy, J. A. y Slamon, D. J. 1998. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol*, 16(8): 2659-71.
- Pérez-Galán, P., Roué, G., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E. y Colomer, D. 2006. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*, 107(1): 257-64.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. y Cottrell, J. S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18): 3551-67.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O. y Botstein, D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797):747-52.
- Pichot, C. S., Hartig, S. M., Xia, L., Arvanitis, C., Monisvais, D., Lee, F. Y., Frost, J. A. y Corey, S. J. 2009. Dasatinib synergizes with doxorubicin to block growth, migration, and invasion of breast cancer cells. *Br J Cancer*, 101(1): 38-47.
- Pietras, R. J., Pegram, M. D., Finn, R. S., Maneval, D. A. y Slamon, D. J. 1998. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene*, 17(17): 2235-49.
- Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B. J., Sela, M. y Yarden, Y. 1996. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J*, 15(10): 2452-67.
- Plowman, G. D., Culouscou, J. M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., Neubauer, M. G. y Shoyab, M. 1993. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(5): 1746-50.
- Podar, K., Raab, M. S., Tonon, G., Sattler, M., Barilà, D., Zhang, J., Tai, Y. T., Yasui, H., Raje, N., DePinho, R. A., Hideshima, T., Chauhan, D. y Anderson, K. C. 2007. Up-regulation of c-Jun inhibits proliferation and induces apoptosis via caspase-triggered c-Abl cleavage in human multiple myeloma. *Cancer Res*, 67(4): 1680-8.
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X. y Perou, C. M. 2010. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12(5): R68.
- Prat, A. y Perou, C. M. 2011. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 5(1): 5-23.
- Price-Schiavi, S. A., Jepson, S., Li, P., Arango, M., Rudland, P. S., Yee, L. y Carraway, K. L. 2002. Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-

- ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer*, 99(6): 783-91.
- Prickett, T. D., Agrawal, N. S., Wei, X., Yates, K. E., Lin, J. C., Wunderlich, J. R., Cronin, J. C., Cruz, P., Rosenberg, S. A. y Samuels, Y. 2009. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet*, 41(10): 1127-32.
- Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., Trier, S. M. y Keely, P. J. 2008. Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys J*, 95(11): 5374-84.
- Psaila, B., Kaplan, R. N., Port, E. R. y Lyden, D. 2006. Priming the 'soil' for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche. *Breast Dis*, 26: 65-74.
- Qin, J. Z., Ziffra, J., Stennett, L., Bodner, B., Bonish, B. K., Chaturvedi, V., Bennett, F., Pollock, P. M., Trent, J. M., Hendrix, M. J., Rizzo, P., Miele, L. y Nickoloff, B. J. 2005. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res*, 65(14): 6282-93.
- Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Reis-Filho, J. S. y Ellis, I. O. 2008. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology*, 52(1): 67-81.
- Ramsauer, V. P., Carraway, C. A., Salas, P. J. y Carraway, K. L. 2003. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. *J Biol Chem*, 278(32): 30142-7.
- Ravichandran, K. S. 2001. Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene*, 20(44): 6322-30.
- Reddy, K. B. 2011. Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol*, 18(4): e173-9.
- Reginato, M. J., Mills, K. R., Paulus, J. K., Lynch, D. K., Sgroi, D. C., Debnath, J., Muthuswamy, S. K. y Brugge, J. S. 2003. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol*, 5(8): 733-40.
- Ri, M., Iid, S., Ishida, T., Ito, A., Yano, H., Inagaki, A., Ding, J., Kusumoto, S., Komatsu, H., Utsunomiya, A. y Ueda, R. 2009. Bortezomib-induced apoptosis in mature T-cell lymphoma cells partially depends on upregulation of Noxa and functional repression of Mcl-1. *Cancer Sci*, 100(2): 341-8.
- Riese, D. J. 2nd, van Raaij, T. M., Plowman, G. D., Andrews, G. C. y Stern, D. F. 1995. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol*, 15(10): 5770-6.
- Riisbro, R., Christensen, I. J., Piironen, T., Greenall, M., Larsen, B., Stephens, R. W., Han, C., Høyer-Hansen, G., Smith, K., Brünnner, N. y Harris, A. L. 2002. Prognostic significance of soluble urokinase plasminogen activator receptor in serum and cytosol of tumor tissue from patients with primary breast cancer. *Clin Cancer Res*, 8(5): 1132-41.
- Ritter, C. A., Perez-Torres, M., Rinehart, C., Guix, M., Dugger, T., Engelman, J. A. y Arteaga, C. L. 2007. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res*, 13(16): 4909-19.
- Rix, U., Hantschel, O., Dürnberger, G., Rensing Rix, L. L., Planyavsky, M., Fernbach, N. V., Kaupe, I., Bennett, K. L., Valent, P., Colinge, J., Köcher, T. y Superti-Furga, G. 2007. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood*, 110(12): 4055-63.
- Rizzatti, E. G., Mora-Jensen, H., Weniger, M. A., Gibellini, F., Lee E., Daibata, M., Lai, R. y Wiestner, A. 2008. Noxa mediates bortezomib induced apoptosis in both sensitive and intrinsically resistant mantle cell lymphoma cells and this effect is independent of constitutive activity of the AKT and NF-kappaB pathways. *Leuk Lymphoma*, 49(4): 798-808.
- Roeten, M. S. F., Cloos, J. y Jansen, G. 2018. Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*, 81(2): 227-43.
- Rolli, M., Fransvea, E., Pilch, J., Saven, A. y Felding-Habermann, B. 2003. Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16): 9482-7.
- Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J., Suman, V. J., Geyer, C. E., Davidson, N. E., Tan-Chiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P. A., Swain, S. M., Pisansky, T. M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L. A., Vogel, V. G., Visscher, D. W., Yothers, G., Jenkins, R. B., Brown, A. M., Dakhil, S. R., Mamounas, E. P., Lingle, W. L., Klein, P. M., Ingle, J. N. y Wolmark, N. 2005. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 353(16): 1673-84.



- Roskoski, R. Jr. 2014. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*, 79: 34-74.
- Rubin Grandis, J., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D. y Tweardy, D. J. 1998. Levels of TGF- $\alpha$  and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst*, 90(11): 824-32.
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. y Normanno, N. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19(3): 183-232.
- Sánchez-Fdez, A., Ortiz-Ruiz, M. J., Re-Louhau, M. F., Ramos, I., Blanco-Múñez, Ó., Ludeña, D., Abad, M., Sánchez-Martín, M., Pandiella, A. y Esparís-Ogando, A. 2019. MEK5 promotes lung adenocarcinoma. *Eur Respir J*, 53(2): 1801327.
- Sato, J. D., Kawamoto, T., Le, A. D. Mendelsohn, J., Polokoff, J. y Sato, G. H. 1983. Biological effects *in vitro* of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med*, 1(5): 511-29.
- Scaltriti, M., Eichhorn, P. J., Cortés, J., Prudkin, L., Aura, C., Jiménez, J., Chandarlapaty, S., Serra, V., Prat, A., Ibrahim, Y. H., Guzmán, M., Gili, M., Rodríguez, O., Rodríguez, S., Pérez, J., Green, S. R., Mai, S., Rosen, N., Hudis, C. y Baselga, J. 2011. Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(9): 3761-6.
- Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B. y Parsons, J. T. 1992. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(11): 5192-6.
- Scher, H. I., Sarkis, A., Reuter, V., Cohen, D., Netto, G., Petrylak, D., Lianes, P., Fuks, Z., Mendelsohn, J. y Cordon-Cardo, C. 1995. Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res*, 1(5): 545-50.
- Scher, K. S. y Somlo, G. 2013. Dasatinib : a novel therapy for breast cancer?. *Expert Opin Investig Drugs*, 22(6): 795-801.
- Schlessinger, J. 2004. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science*, 306(5701): 1506-7.
- Schwartz, A. L. y Ciechanover, A. 2009. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 49: 73-96.
- Schwartzberg, L. S., Blakely, L. J., Schnell, F., Christianson, D., Andrews, M., Johns, A. y Walker, M. Phase I/II trial of ixabepilone (Ixa) and dasatinib (D) for treatment of metastatic breast cancer (MBC). Presentado en el 102nd AACR Annual Meeting, Orlando, 2011.
- Scully, O. J., Bay, B. H., Yip, G. y Yu, Y. 2012. Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*, 9(5): 311-20.
- Seoane S., Montero J. C., Ocaña A. y Pandiella A. 2010. Effect of multikinase inhibitors on caspase-independent cell death and DNA damage in HER2-overexpressing breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 102(18): 1432-46.
- Seoane S., Montero J. C., Ocaña A. y Pandiella A. 2016. Breast cancer dissemination promoted by a neuregulin-collagenase 3 signalling node. *Oncogene*, 35(21): 2756-65.
- Shabaneh, T. B., Downey, S. L., Goddard, A. L., Screen, M., Lucas, M. M., Eastman, A. y Kisselev, A. F. 2013. Molecular basis of differential sensitivity of myeloma cells to clinically relevant bolus treatment with bortezomib. *PLoS One*, 8(2): e56132.
- Shattuck, D. L., Miller, J. K., Carraway, K. L. y Sweeney, C. 2008. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res*, 68(5): 1471-7.
- Sheffield, L. G. 1998. C-Src activation by ErbB2 leads to attachment-independent growth of human breast epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 250(1): 27-31.
- Shen, M., Schmitt, S., Buac, D. y Dou, Q. P. 2013. Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 17(9): 1091-108.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68(5): 850-8.
- Shi, C., Zhang, G. B. y Yin, S. W. 2015. Effect of bortezomib on migration and invasion in cervical carcinoma HeLa cell. *Asian Pac J Trop Med*, 8(6): 485-8.
- Shi, F., Telesco, S. E., Liu, Y., Radhakrishnan, R. y Lemmon, M. A. 2015. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(17): 7692-7.

- Shi, Y., Yu, Y., Wang, Z., Wang, H., Bierkehazhi, S., Zhao, Y., Suzuk, L. y Zhang, H. 2016. Second-generation proteasome inhibitor carfilzomib enhances doxorubicin-induced cytotoxicity and apoptosis in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(45): 73697-710.
- Shor, A. C., Keschman, E. A., Lee, F. Y., Muro-Cacho, C., Letson, G. D., Trent, J. C., Pledger, W. J. y Jove, R. 2007. Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on SRC kinase for survival. *Cancer Res*, 67(6): 2800-8.
- Simpson, L. y Parsons, R. 2001. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res*, 264(1): 29-41.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. y McGuire, W. L. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785): 177-82.
- Soltoff, S. P. y Cantley, L. C. 1996. p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J Biol Chem*, 271(1): 563-7.
- Somlo, G., Atzori, F., Strauss, L. C., Geese, W. J., Specht, J. M., Gradishar, W. J., Rybicki, A., Sy, O., Vahdat, L. T. y Cortes, J. 2013. Dasatinib plus capecitabine for advanced breast cancer: safety and efficacy in phase I study CA180004. *Clin Cancer Res*, 19(7): 1884-93.
- Soung, Y. H., Lee, J. W., Kim, S. Y., Wang, Y. P., Jo, K. H., Moon, S. W., Park, W. S., Nam, S. W., Lee, J. Y., Yoo, N. J. y Lee, S. H. 2006. Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers. *Int J Cancer*, 118(6):1426-9.
- Spector, N. L. y Blackwell, K. L. 2009. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 27(34): 5838-47.
- Srinivasan, R., Benton, E., McCormick, F., Thomas, H. y Gullick, W. J. 1999. Expression of the c-erbB-3/HER-3 and c-erbB-4/HER-4 growth factor receptors and their ligands, neuregulin-1 alpha, neuregulin-1 beta, and betacellulin, in normal endometrium and endometrial cancer. *Clin Cancer Res*, 5(10): 2877-83.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S. y Mesirov, J. P. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43): 15545-50.
- Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D. y Collins, V. P. 1990. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(21): 8602-6.
- Summy, J. M. y Gallick, G. E. 2003. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 22(4): 337-58.
- Sunwoo, J. B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Crowl Bancroft, C., Sausville, E., Adams, J., Elliott, P. y Van Waes, C. 2001. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 7(5): 1419-28.
- Sánchez-Martín, M. y Pandiella, A. 2012. Differential action of small molecule HER kinase inhibitors on receptor heterodimerization: therapeutic implications. *Int J Cancer*, 131(1): 244-52.
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E. y Børresen-Dale, A. L. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19): 10869-74.
- Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A. L. y Botstein, D. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14): 8418-23.
- Tai, Y. T., Fulciniti, M., Hideshima, T., Song, W., Leiba, M., Li, X. F., Rumizen, M., Burger, P., Morrison, A., Podar, K., Chauhan D., Tassone, P., Richardson, P., Munshi, N. C., Ghobrial, I. M. y Anderson, K. C. 2007. Targeting MEK induces myeloma-cell cytotoxicity and inhibits osteoclastogenesis. *Blood*, 110(5): 1656-63.
- Tanaka, K. 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85(1): 12-36.
- Tatake, R. J., O'Neill, M. M., Kennedy, C. A., Wayne, A. L., Jakes, S., Wu, D., Kugler, S. Z., Kashem M. A., Kaplita, P. y Snow, R. J. 2008. Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(1): 120-5.

- Thaler, S., Thiede, G., Hengstler, J. G., Schad, A., Schmidt, M. y Sleeman, J. P. 2015. The proteasome inhibitor Bortezomib (Velcade) as potential inhibitor of estrogen receptor-positive breast cancer. *Int J Cancer*, 137(3): 686-697.
- Thomas, S. M. y Brugge, J. S. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13: 513-609.
- Thornton, J. D., Liu, R., Orlowski, R. Z., *et al.* Doxorubicin-induced NF-kappaB activation in breast cancer is overcome by proteasome inhibition, resulting in enhanced tumoricidal response to treatment. Presentado en el 87th Annual Clinical Congress of the American College of Surgeons, Nueva Orleans, 2001.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. y Pickart, C. M. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 19(1): 94-102.
- Toutant, M., Costa, A., Studler, J. M., Kadaré, G., Carnaud, M. y Girault, J. A. 2002. Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol*, 22(22): 7731-43.
- Trevino, J. G., Summy, J. M., Lesslie, D. P., Parikh, N. U., Hong, D. S., Lee, F. Y., Donato, N. J., Abbruzzese, J. L., Baker, C. H. y Gallick, G. E. 2006. Inhibition of SRC expression and activity inhibits tumor progression and metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells in an orthotopic nude mouse model. *Am J Pathol*, 168(3): 962-72.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B. J. y Yarden Y. 1996. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 16:5276-87
- Valabrega, G., Capellero, S., Cavalloni, G., Zaccarello, G., Petrelli, A., Migliardi, G., Milani, A., Peraldo-Neia, C., Gammaitoni, L., Sapino, A., Pecchioni, C., Moggio, A., Giordano, S., Aglietta, M. y Montemurro, F. 2011. HER2-positive breast cancer cells resistant to trastuzumab and lapatinib lose reliance upon HER2 and are sensitive to the multitargeted kinase inhibitor sorafenib. *Breast Cancer Res Treat*, 130(1): 29-40.
- Valabrega, G., Montemurro, F., Sarotto, I., Petrelli, A., Rubini, P., Tacchetti, C., Aglietta, M., Comoglio, P. M. y Giordano, S. 2005. TGFalpha expression impairs Trastuzumab-induced HER2 downregulation. *Oncogene*, 24(18): 3002-10.
- van der Geer, P., Wiley, S., Gish, G. D. y Pawson, T. 1996. The Shc adaptor protein is highly phosphorylated at conserved, twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein-protein interactions. *Curr Biol*, 6(11): 1435-44.
- Van Waes, C., Chang, A. A., Lebowitz, P. F., Druzgal, C. H., Chen, Z., Elsayed, Y. A., Sunwoo, J. B., Rudy, S. F., Morris, J. C., Mitchell, J. B., Camphausen, K., Gius, D., Adams, J., Sausville, E. A. y Conley, B. A. 2005. Inhibition of nuclear factor-kappaB and target genes during combined therapy with proteasome inhibitor bortezomib and reirradiation in patients with recurrent head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 63(5): 1400-12.
- Venkateswarlu, S., Dawson, D. M., St Clair, P., Gupta, A., Willson, J. K. y Brattain, M. G. 2002. Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*, 21(1): 78-86.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J. y Deshaies, R. J. 2004. Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell*, 118(1): 99-110.
- Vezina, H. E., Cotreau, M., Han, T. H., y Gupta, M. 2017. Antibody-drug conjugates as cancer therapeutics: past, present, and future. *J Clin Pharmacol*, 57(Sup 10): S11-S25.
- Vielreicher, M., Harms, G., Butt, E., Walter, U. y Obergfell, A. 2007. Dynamic interaction between Src and C-terminal Src kinase in integrin alphaIIb beta3-mediated signaling to the cytoskeleton. *J Biol Chem*, 282(46): 33623-31.
- Vogel C. L., Burris H. A., Limentani S., Borson R., O'Shaughnessy J., Vukelja S., Agresta S., Klencke B., Birkner M. y Rugo H. 2009. A phase II study of trastuzumab-DM1 (T-DM1), a HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with HER2+ metastatic breast cancer (MBC): Final results. *Journal of Clinical Oncology*, 27(15\_suppl): 1017-1017.
- Wang, X., D'Arcy, P., Caulfield, T. R., Paulus, A., Chitta, K., Mohanty, C., Gullbo, J., Chanan-Khan, A. y Linder, S. 2015. Synthesis and evaluation of derivatives of the proteasome deubiquitinase inhibitor b-AP15. *Chem Biol Drug Des*, 86(5): 1036-48.
- Wang, Y., Rishi, A. K., Puliyappadamba, V. T., Sharma, S., Yang, H., Tarca, A., Dou, Q. P., Lonardo, F., Ruckdeschel, J. C., Pass, H. I. y Wali, A. 2010. Targeted proteasome inhibition by Velcade induces apoptosis in human mesothelioma and breast cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, 66(3): 455-66.

- Wen, D., Suggs, S. V., Karunakaran, D., Liu, N., Cupples, R. L., Luo, Y., Janssen, A. M., Ben-Baruch, N., Trollinger, D. B. y Jacobsen, V. L. (1994) 'Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors', *Mol Cell Biol*, 14(3): 1909-19.
- Wen, X. F., Yang, G., Mao, W., Thornton, A., Liu, J., Bast, R. C. y Le, X. F. 2006. HER2 signaling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy. *Oncogene*, 25(52): 6986-96.
- Wendt, M. K., Taylor M. A., Schiemann, B. J. y Schiemann, W. P. 2011. Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. *Mol Biol Cell*, 22(14): 2423-35.
- Williams, S., Pettaway, C., Song, R., Papandreou, C., Logothetis, C. y McConke, D. J. 2003. Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*, 2(9): 835-43.
- Witton, C. J., Reeves, J. R., Going, J. J., Cooke, T. G. y Bartlett, J. M. 2003. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol*, 200(3): 290-7.
- Wright, G. L., Blum, J., Krekow, L. K., McIntyre, K. J., Wilks, S. T., Rabe, A. C., Vukelja, S. J., Andersen, J. C., Wang, Y., Asmar, L. y O'Shaughnessy, J. Randomized Phase II Trial of Fulvestrant with or without Dasatinib in Postmenopausal Patients with Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated with an Aromatase Inhibitor. Presentado en el 34th Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, 2011.
- Wyckoff, J. B., Pinner, S. E., Gschmeissner, S., Condeelis, J. S. y Sahai, E. 2006. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol*, 16(15): 1515-23.
- Xu, L. H., Owens, L. V., Sturge, G. C., Yang, X., Liu, E. T., Craven, R. J. y Cance, W. G. 1996. Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ*, 7(4): 413-8.
- Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S. y Arteaga, C. L. 2002. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res*, 62(14): 4132-41.
- Yamanaka, Y., Friess, H., Kobrin, M. S., Buchler, M., Beger, H. G. y Korc, M. 1993. Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res*, 13(3): 565-9.
- Yang, X., Shi, Z., Zhang, N., Ou, Z., Fu, S., Hu, X. y Shen, Z. 2014. Suberoyl bis-hydroxamic acid enhances cytotoxicity induced by proteasome inhibitors in breast cancer cells. *Cancer Cell Int*, 14: 107.
- Yang, Y., Ikezoe, T., Saito, T., Kobayashi, M., Koeffler, H. P. y Taguchi, H. 2004. Proteasome inhibitor PS-341 induces growth arrest and apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the JNK/c-Jun/AP-1 signaling. *Cancer Sci*, 95(2): 176-80.
- Yang, Z., Liu, S., Zhu, M., Zhang, H., Wang, J., Xu, Q., Lin, K., Zhou, X., Tao, M., Li, C. y Zhu, H. 2016. PS341 inhibits hepatocellular and colorectal cancer cells through the FOXO3/CTNNB1 signaling pathway. *Sci Rep*, 6: 22090.
- Yarden, Y. y Pines, G. 2012. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer*, 12(8): 553-63.
- Yarden, Y. y Sliwkowski, M. X. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2): 127-37.
- Yerlikaya, A. y Erin, N. 2008. Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor Velcade. *Int J Mol Med*, 22(6): 817-23.
- Yerlikaya, A., Okur, E. y Ulukaya, E. 2012. The p53-independent induction of apoptosis in breast cancer cells in response to proteasome inhibitor bortezomib. *Tumour Biol*, 33(5):1385-92.
- Yilmaz, M. y Christofori, G. 2010. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res*, 8(5): 629-42.
- Yu, H. y Jove, R. 2004. The STATs of cancer--new molecular targets come of age', *Nat Rev Cancer*, 4(2): 97-105.
- Yu, J., Tiwari, S., Steiner, P. y Zhang, L. 2003. Differential apoptotic response to the proteasome inhibitor Bortezomib [VELCADE, PS-341] in Bax-deficient and p21-deficient colon cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 2(6): 694-9.
- Yuste, L., Montero, J. C., Esparís-Ogando, A. y Pandiella, A. 2005. Activation of ErbB2 by overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to herceptin. *Cancer Res*, 65(15): 6801-10.

Zhang, B., Cao, X., Liu, Y., Cao, W., Zhang, F., Zhang, S., Li, H., Ning, L., Fu, L., Niu, Y., Niu, R., Sun, B. y Hao, X. 2008. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer*, 8: 83.

Zhang, S., Huang, W. C., Zhang, L., Zhang, C., Lowery, F. J., Ding, Z., Guo, H., Wang, H., Huan, S., Sahin, A. A., Aldape, K. D., Steeg, P. S. y Yu, D. 2013. SRC family kinases as novel therapeutic targets to treat breast cancer brain metastases. *Cancer Res*, 73(18): 5764-74.

Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A. y Kuriyan, J. 2006. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125(6): 1137-49.

Zhang, X. H., Wang, Q., Gerald, W., Hudis, C. A., Norton, L., Smid, M., Foekens, J. A. y Massagué, J. 2009. Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signal. *Cancer Cell*, 16(1): 67-78.

Zhou, H. J., Wang, J., Yao, B., Wong, S., Djakovic, S., Kumar, B., Rice, J., Valle, E., Soriano, F., Menon, M. K., Madriaga, A., Kiss von Soly, S., Kumar, A., Parlati, F., Yakes, F. M., Shawver, L., Le Moigne, R., Anderson, D. J., Rolfe, M. y Wustrow, D. 2015. Discovery of a First-in-Class, Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of the p97 AAA ATPase (CB-5083). *J Med Chem*, 58(24): 9480-97.

Ziogas, D. C., Terpos, E., Kastritis, E. y Dimopoulos, M. A. 2017. An overview of the role of carfilzomib in the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Pharmacother*, 18(17): 1883-97.



# FINANCIACIÓN

---





Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigación del Cáncer-Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CIC-IBMCC), centro mixto de la Universidad de Salamanca (USAL) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), bajo la dirección de Atanasio Pandiella Alonso, Profesor de Investigación en Biología y Biomedicina del CSIC.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a una ayuda para la contratación de personal investigador en formación de la USAL cofinanciada por el Banco Santander.

El desarrollo de este trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos “Nuevas estrategias para tratar el cáncer de mama positivo para HER2” financiado por la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), “Señalización por receptores ERBB/HER” (BFU2012-39151) financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), “Señalización por receptores ERBB/HER en cáncer” (BFU2015-71371-R) financiado por el MINECO y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y “Señalización por receptores ERBB/HER en cáncer” (CSI002U16) financiado por la Junta de Castilla y León y por el FEDER. Durante el desarrollo del mismo, el laboratorio de Atanasio Pandiella Alonso ha recibido apoyo adicional de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), del Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC) del ISCIII y de la Fundación de Investigación CRIS Contra el Cáncer.

La autora también ha recibido apoyo a través de la USAL y de la RTICC para asistencia a congresos.



# **AGRADECIMIENTOS**

---



No se me ocurre mejor manera de cerrar una etapa del complejo viaje que es la vida, que dando las gracias a los que nos han acompañado durante la misma. A través de estas líneas, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que habéis hecho posible el desarrollo de esta tesis doctoral tanto a nivel académico como personal.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis la ayuda y entrega durante estos años. Gracias, Apa, por confiar en mí, por abrirme las puertas del laboratorio, por permitirme desarrollar estos proyectos, por dirigirlos y por ayudarme a crecer con tus enseñanzas.

A todos mis compañeros del laboratorio. A los que estabais y seguís estando. A Juan Carlos, por dejarme aprender a tu lado, por enseñarme tanto y porque parte de esta tesis es tuya. A Elena, por compartir conocimiento y experiencia, por tus ideas y por tu ayuda desinteresada. A Azu, por estar dispuesta a ayudar siempre y por tanto cariño tan sincero como tú. A Yolanda, por anteponer los intereses comunes del laboratorio a los tuyos propios. A Adri, por ser una más y por llenar el vacío que dejó Vir a mi lado siendo un gran compañero de poyata. A los que estabais y ya no estáis. A Sandra, por hacer más fácil mi adaptación al laboratorio. A Vir, por enseñarme las instalaciones del centro el día que llegué, por ayudarme con las gestiones burocráticas y por ser una gran compañera de poyata. A Carla, por guiar mis manos durante mis primeros días en el laboratorio, por hacer de la exageración un arte y por haber sido el hilo musical que tanto amor lleva. A Flor, por tu autenticidad, por nuestras reflexiones sobre la vida y por invitarme a bailar contigo. A Sara, por compartir ilusiones en los comienzos de esta etapa y por el aprendizaje realizado juntas. A Ana, por querer ayudar siempre y por compartir nuestros paseos hasta casa. A los que llegasteis. A Ari, por no tardar en hacerlo, por ser cómplice y compañera de aventura, por tu amistad y cariño. A Elisa, por tu cariño, por tu dulzura y por tu determinación. A Lola, por enseñarme otra forma de entender la vida, por dejarme ejercer de hermana mayor y por los buenos momentos compartidos. A Patricia, por pertenecer a ese grupo de personas que traen luz y alegría cuando aparecen, por nuestras tardes de los viernes en cultivos, por tu sentido del humor, por tu apoyo, por tener siempre tiempo para mí y por los abrazos con cuello. A Laura, por ser una profesional de la vida, porque aprendo contigo cada día, por asignar a cada estado de ánimo una canción y por llenarme de cariño. A Lucía, por poner la nota de humor a cada momento de la vida, por estar pendiente de cualquier altibajo que tenga y por no dejarme caer. A Javi, por reencontrarme con la bioinformática, por tu contribución a este trabajo, por el trabajo desarrollado juntos y por tu bondad. A Laura S. y a Jorge, por hacerme revivir mis primeros días en el laboratorio y por compartir vuestra ilusión por hacer ciencia. A Idoia y a Alexandra, por vuestro gran compañerismo y por ser simplemente geniales. A los que nos visitasteis para hacernos más cosmopolitas sin movernos del sitio. Gracias, Al-Mahy, Aida, Bachir, Adriana, Elaine, Ana,

Claudriana, Francis, Marianne y Alessandro, por dejar en mí una parte de vuestra cultura, por entendernos sin importar el idioma y por los grandes momentos compartidos.

A Samuel Seoane, por sentar las bases para la realización de una parte importante de esta tesis y por tu contribución a la misma.

A todos los compañeros del CIC-IBMCC, por contribuir al buen funcionamiento del centro y por estar dispuestos a ayudar siempre. A Jesús Pérez-Losada, por cedernos algunas de las líneas celulares empleadas para la realización de este trabajo. A Eugenio Santos, por compartir reactivos para el desarrollo de este trabajo. A Pilar Licerias-Boillos, por la ayuda con el protocolo de activación de RAS. A Pedro A. Lazo-Zbikowski, a Elena Martín y a Nacho Campillo, por compartir conocimiento y experiencia con los protocolos de transfección. A Rosa Dégano, por contagiar tu pasión por la proteómica y por ser tan didáctica. A Encarna Fermiñán, A María Sacristán y a Telmo Rodrigues, por vuestro tiempo y por vuestra predisposición para ayudar. A Ángel Prieto y a Ana García, por toda la ayuda en microscopía y citometría.

A mis amigos. Gracias por vuestra amistad y por el apoyo constante. A Laura, Patricia, Irene, Maite, Aldara, Nuria, Miguel, Mario y Ricardo, por estar cerca a pesar de la distancia. A Vanessa, Sara, Ester, Valentina, Monty, Gloria, Arturo y Albertini porque ha sido un regalo conocerlos. A Fer y a Sergio, por vuestro corazón inmenso, por vuestra gran generosidad, por cuidarme como a una más de la familia y por tenerme completamente conquistada.

A mi familia. Gracias a cada uno de vosotros por ser una pieza fundamental y necesaria del puzzle que hubiera elegido si hubiera podido. A mis yayos, por enseñarme los valores más importantes de la vida, por vuestra confianza ciega y por un amor que no conoce límites. A mis tíos y primos, por preocuparos de cómo me va por Salamanca, por las celebraciones que nos reúnen a todos y por tanto cariño. A Coral, Rosa Victoria, Yulisa, Óliver, y Zilvinas, por ser amigos además de primos y porque con vosotros todo es fácil.

A mi hermano. Gracias por nuestra complicidad, por vacilarme con tanta gracia, por tu soltura descarada, por tu energía y optimismo desmesurados, por ayudarme a cultivar la paciencia y a creer que puedo conseguir lo que me proponga.

A mis padres. No creo que nadie tenga ninguna duda de que nada de esto hubiera sido posible sin vosotros. Gracias por vuestra forma tan generosa de entender la vida y por vuestra sencillez. Gracias por vuestros consejos, por vuestro apoyo y por guiarme en mis decisiones. Gracias por pertenecer al grupo de las mejores personas que conozco. No me canso de admiraros cada día. Todavía tengo mucho que aprender de vosotros.

A Salamanca, a sus atardeceres mágicos y a sus rincones de ensueño. Gracias por tanto.